



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A  
KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ  
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

# MATEMATICKÉ HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ EXTRAKTŮ Z ROSTLIN

EXPLANTATION AND ANALYSIS OF PLANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

BLAHOSLAV KAŠPAR

VEDOUcí PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. MARTIN VALLA

KONZULTANT  
CONSULTANT

doc. Ing. RENÉ KIZEK, Ph.D.

BRNO 2010



**VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií**

**Ústav biomedicínského inženýrství**

# **Bakalářská práce**

bakalářský studijní obor

**Biomedicínská technika a bioinformatika**

**Student:** Blahoslav Kašpar

**ID:** 109605

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2009/2010

## **NÁZEV TÉMATU:**

**Matematické hodnocení antioxidačních vlastností extraktů z rostlin**

## **POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

Seznamte se s postupem analýzy DNA od přípravy vzorku, přes purifikaci, polymerázovou řetězovou reakci (PCR), gelovou elektroforézu až po sekvenaci. Seznamte se s možnostmi přístrojů, které jsou dostupné na Ústavu biomedicínského inženýrství, a uveďte seznam potřebných reagentů. Pro analýzu DNA připravte explantátové kultury křídlatky japonské, která bude hodnocena z hlediska jejího růstu. Zhodnoťte růst explantátu metodami analýzy obrazu. Z připraveného rostlinného materiálu budou připraveny vhodné extrakty (postup bude optimalizován). Extrakty budou vybranou metodou analyzovány a získaná data následně matematicky zpracována a vyhodnocena.

## **DOPORUČENÁ LITERATURA:**

- [1] Mcpherson, M., Moller, G.: PCR : Second Edition. 2nd compl. edition. [s.l.] : Taylor & Francis Group, 2006. 292 s. The Basics. ISBN 0-4153-5547-8
- [2] Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Lynn B. Jorde. USA : Wiley, 2005. 3897. ISBN 0470849746.

**Termín zadání:** 8.2.2010

**Termín odevzdání:** 31.5.2010

**Vedoucí práce:** Ing. Martin Valla

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

## **UPOZORNĚNÍ:**

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá antioxidační aktivitou antioxidantů a metodami pro její měření. Antioxidanty jsou látky, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Tím omezují proces oxidace v organismu nebo směsích, kde se vyskytují. Významným zdrojem antioxidantů jsou rostliny. Antioxidační aktivita křídlatky japonské byla měřena metodou FRAP automatickým spektrometrem a dále matematicky vyhodnocena pomocí programu vytvořeného v MATLABU.

## Abstract

The bachelor thesis is focused on the study of antioxidants and detection methods of their antioxidant activity. Antioxidants are substances able to scavenge the activity of oxygen radicals. This ability protects critical cellular structures from oxidation. In nature, plants belong to the important sources of antioxidants. In this thesis we are specifically focused on the detection of antioxidant activity of Japanese knotweed extracts using FRAP ("Ferric Reducing Antioxidant Power") with automatic UV-Vis spectrometer. The data obtained were treated with the mathematical program developed in MATLAB.

## Klíčová slova

Antioxidanty, křídlatka japonská, antioxidační aktivita, FRAP, MINDRAY BS-200

## Keywords

Antioxidants, japanese knotweed, antioxidation activity, FRAP, MINDRAY BS-200

## Bibliografická citace

KAŠPAR, B. *Matematické hodnocení antioxidačních vlastností extraktů z rostlin: bakalářská práce*. Brno: FEKT VUT v Brně, 2010. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Valla.

## Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Matematické hodnocení antioxidačních vlastností extraktů z rostlin jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 31. května 2010

.....  
podpis autora

## Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinu Vallovi za jeho trpělivost, pedagogickou a odbornou pomoc.

Velké poděkování patří především Mgr. Olze Kryštofové za její ochotu, trpělivost, pomoc a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

Rád bych poděkoval doc. Ing. Renému Kizkovi, Ph.D. za možnost realizace bakalářské práce, rady, připomínky, velkou trpělivost a ochotu.

V Brně dne 31. května 2010

.....  
podpis autora

# OBSAH

1	Seznam obrázků .....	6
2	Seznam tabulek .....	7
3	Úvod.....	8
4	Cíle práce.....	9
5	Biologický základ.....	10
5.1	Explantátové kultury .....	10
5.1.1	Kultivační média pro explantátové kultury .....	11
5.1.2	Metody získávání explantátových kultur .....	13
6	Křídlatka japonská ( <i>Reynoutria japonica</i> ) .....	14
7	Spektrometrie .....	15
7.1	Ultrafialová a viditelná spektrometrie.....	16
8	Oxidativní stres .....	18
8.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS) .....	19
8.2	Neenzymatická produkce reaktivních forem kyslíku.....	19
9	Antioxidanty.....	21
9.1	Metody stanovení antioxidační aktivity .....	22
9.1.1	Metody založené na eliminaci radikálů.....	22
9.1.2	Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek .....	24
10	Použité materiály a metody .....	25
10.1	Příprava vzorku .....	25
10.2	Chemikálie .....	26
10.3	Stanovení svěží hmotnosti.....	26
10.4	Fotografická dokumentace .....	26
10.5	Metody pro stanovení antioxidační aktivity.....	26
10.5.1	Stanovení DPPH.....	26
10.5.2	Stanovení TEAC .....	26
10.5.3	Stanovení FRAP .....	26
10.6	Přístroje .....	27
10.6.1	Spektrometr MINDRAY BS-200.....	27
10.6.2	Centrifuga Hettich MIKRO 200.....	28
10.6.3	Laboratorní třepačka IKA MS 3 digital .....	28
11	Výsledky a diskuse.....	29
11.1	Tvorba programu pro matematickou analýzu a vyhodnocení dat .....	29
11.1.1	Program spektrak1.....	29
11.1.2	Funkce programu.....	30
11.1.3	Ukázka práce programu .....	32
11.2	Experimentální schéma .....	34
11.3	Hmotnostní analýza.....	35
11.4	Stanovení antioxidační aktivity .....	36
12	Závěr.....	39
13	Seznam zkratk .....	40
14	Literatura .....	41

# 1 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Explantátová kultura křídlatky japonské</i> .....	10
Obrázek 2: <i>Křídlatka japonská</i> .....	14
Obrázek 3: <i>Rozklad světla pomocí optického hranolu</i> .....	15
Obrázek 4: <i>Schéma uspořádání spektrofotometru</i> .....	16
Obrázek 5: <i>Schéma redukce molekulárního kyslíku v buňce</i> .....	19
Obrázek 6: <i>Haberova-Weissova reakce</i> .....	20
Obrázek 7: <i>Fentonova reakce</i> .....	20
Obrázek 8: <i>Antioxidanty</i> .....	21
Obrázek 9: <i>Kyvety – metoda TEAC</i> .....	22
Obrázek 10: <i>Kyvety – metoda DPPH</i> .....	23
Obrázek 11: <i>Kyvety - metoda FRAP</i> .....	24
Obrázek 12: <i>Schéma přípravy vzorků</i> .....	25
Obrázek 13: <i>Přístroj MINDRAY BS-200</i> .....	27
Obrázek 14: <i>Centrifuga Hettich Mikro 200</i> .....	28
Obrázek 15: <i>Laboratorní třepačka IKA MS 3 digital</i> .....	28
Obrázek 16: <i>Prostředí programu „spektral1“</i> .....	29
Obrázek 17: <i>Ukázka vstupních dat z přístroje BS-200 ve formátu txt</i> .....	30
Obrázek 18: <i>Nápověda programu spektral1</i> .....	31
Obrázek 19: <i>Vstupní data</i> .....	32
Obrázek 20: <i>Signál FRAP bez použití mediánového filtru</i> .....	32
Obrázek 21: <i>Signál pro průchodu mediánovým filtrem</i> .....	33
Obrázek 22: <i>Schéma pracovního postupu experimentu</i> .....	34
Obrázek 23: <i>Fotografická dokumentace kultivace explantátové kultury křídlatky japonské</i> ...	35
Obrázek 24: <i>Vývoj hmotnosti explantátové kultury vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů po dobu experimentu</i> .....	36
Obrázek 25: <i>Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení kademnatých iontů o koncentraci 10<math>\mu</math>M po dobu experimentu – metoda FRAP</i>	36
Obrázek 26: <i>Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu – metoda FRAP</i> .....	37
Obrázek 27: <i>Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu – metoda TEAC</i> .....	37
Obrázek 28: <i>Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu – metoda DPPH</i> .....	38

## 2 Seznam tabulek

Tabulka 1: <i>Specifikace MINDRAY BS-200 [37]</i> .....	27
Tabulka 2: <i>Technické údaje přístroje Hettich Mikro 200 [38]</i> .....	28
Tabulka 3: <i>Technické údaje přístroje IKA MS3 digital [39]</i> .....	28

### 3 Úvod

Antioxidační vlastnosti rostlin jsou v dnešní „biodobě“ velice atraktivní pojem hojně užívaný od výrobců kosmetiky až po propagátory zdravé výživy. Látky, které tyto vlastnosti vykazují se nazývají antioxidanty. Vyskytují se v rostlinách i lidském těle. Antioxidanty představují ochranu proti oxidaci např. stárnutí pleti, zkažení potravin.

Měření antioxidačních vlastností probíhá v laboratořích pomocí přístrojové techniky. Jelikož jde o velice drahé přístroje, zuří i v oblasti tohoto bussinesu konkurenční boje. Právě tato skutečnost má za následek téměř nemožnost vzniku vzájemné kompatibility techniky či softwaru produkovanými různými výrobci ze všech koutů světa. Bohužel nejhůře z tohoto boje dopadne spotřebitel, v tomto případě pracovník laboratoře. Ten má tak často při práci svázané ruce a část svého času věnuje nevědecké činnosti.

Hlavním důvodem popularity antioxidantů není jen jejich blahodárný vliv na lidský organismus jak si možná mnozí myslí, ale fakt že antioxidanty jsou pro člověka zcela nepostradatelné. V našem organismu totiž neustále vznikají částice, které pro nás představují trvalé potenciální nebezpečí. Tyto částice se odborně nazývají volné radikály, jsou vysoce reaktivní, schopné přijmout vazebný elektron jiné sloučeniny a velmi ochotně se spojují s jinými sloučeninami čímž je mění. Mohou tak poškodit buňky, oslabit imunitní systém a napomáhat tak ke vzniku řady onemocnění. Proto je nutné, aby tyto částice byly v lidském organismu ihned po svém vzniku zachyceny a zničeny. Tuto schopnost vykazují právě antioxidanty.

Volné radikály jsou látky, které se v těle tvoří při látkové přeměně, při obraně před bakteriemi a při expozici ultrafialovým nebo ionizačním zářením. K jejich tvorbě přispívají také nemoci, kouření či nadměrné vystavení vlivům znečištěného životního prostředí. Některé volné radikály jsou běžnou součástí zdravého metabolismu. Také stárnutím se zvyšuje tvorba volných radikálů a zároveň snižuje schopnost jejich eliminace, což vede ke změně vazivové tkáně, k poruše pružnosti vaziva a vzniku vrásek. Ke změnám dochází také ve vnitřních orgánech, šlachách, svalech a cévách. Volné radikály způsobují rychlé opotřebovávání tělních buněk. [1]

Nebýt antioxidantů, řada lidí by během několika měsíců padla za oběť nejrůznějším infekcím, lidské tělo by předčasně zestárlo, buňky a orgány by ztratili schopnost regenerace, došlo by k narušení imunity, oběhového systému, zvýšení krevní srážlivosti, k rozvrácení metabolismu a narušení ochranné a podpůrné funkce enzymů a různých živin. Lidské tělo sice produkuje vlastní účinné antioxidanty, i tak je ovšem nutné přijímat je v potravě. Naše potrava je ovšem kvantitativně i kvalitativně odlišná od potravy našich biologických předchůdců. Dalším neméně podstatným rozdílem je nynější životní styl tj. žití v nezdravém životním prostředí a stresu. Těmito důvody je důležitost antioxidantů zcela neoddiskutovatelně umocněna. [1]



## 4 Cíle práce

- Příprava explantátové kultury křídlatky japonské
- Hodnocení růstu explantátové kultury
- Příprava rostlinného materiálu pro analýzu
- Analýza a výběr metody
- Matematické zpracování dat
- Vyhodnocení

# 5 Biologický základ

## 5.1 Explantátové kultury

Abychom mohli studovat vliv těžkých kovů jako faktorů vnějšího prostředí na celistvé rostliny, je nezbytné pochopit regeneraci a vliv kultivačních podmínek na rostliny v podmínkách *in vitro*. Velmi zajímavé a potřebné se zdá studium explantátových kultur rostlin [2].

Explantátové kultury rostlin (viz. obr. 1) vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za umělých podmínek, což znamená oddělení určité části ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny a umístění této části rostliny do sterilního prostředí, kde se kultivuje. V rostlinném organismu jsou všechny buňky totipotentní. Teoreticky lze tedy říci, že pro odvození explantátové kultury je vhodné jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem.

Růst a vývoj explantátových kultur umožňují kultivační podmínky. Zahrnují především médium, které představuje zdroj energie, výživy a regulačních látek. Dále k nim patří světelný režim, tj. intenzita a kvalita světla a fotoperioda. Významnou úlohu hraje i teplota. Za určitých podmínek mohou být z explantátových kultur dopěstovány nové rostliny. Tento proces je uskutečněn podle následujícího cyklu: rostlina – explantát – kultura *in vitro* – organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina.



**Obrázek 1:** *Explantátová kultura křídlatky japonské*

Cílem většiny manipulací *in vitro* je získat novou rostlinu. V explantátové kultuře lze vyvolat růst a další vývoj základů orgánů, které již byly založeny na donorové rostlině. Podmínky kultivace mohou stimulovat a urychlovat průběh morfogenního procesu; dochází k dokončení vývinu izolovaného embrya a k jeho klíčení, nebo vytváření postranních větví z axilárních pupenů a k tvorbě nových axilárních pupenů na těchto větvích. Podle charakteru nově vzniklých struktur rozlišujeme organogenezi, somatickou embryogenezi (popř. somatickou polyembryogenezi) a pylovou embryogenezi či androgenezi. Při somatické embryogenezi vznikají ze somatických buněk embrya podobná embryím zygotickým. U somatické polyembryogeneze se vzniklá somatická embrya v raném stádiu vývinu sama dále kontinuálně množí [3].

Úspěšnost kultivace explantátových kultur je ovlivněna četnými faktory [4]; mezi nejdůležitější patří:

- orgán, ze kterého byl izolován explantát,
- fyziologické a ontogenetické stádium rostliny,
- období odběru explantátu,
- velikost explantátu,
- zdravotní stav donorové rostliny,
- genotyp,
- orientace explantátu,
- inokulační hustota.

### 5.1.1 Kultivační média pro explantátové kultury

Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách rostlin. Média používaná pro kultivaci buněk, pletiv a orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny, sacharidy, zpevňující látku a růstové regulátory.

Mezi makroelementy dodávané do kultivačních médií patří šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra. Koncentrace jednotlivých prvků je závislá na rostlinném druhu.

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst explantátových kultur patří železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór. Tyto prvky však nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné.

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza. Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů. Schopnost explantátů vyživovat se autotrofně je velmi omezena.

Vitamíny jsou pro rostliny nezbytné jako katalyzátory metabolických procesů. Jsou nezbytné k růstu a vývoji rostlin. Pro explantátové kultury jsou vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi nejčastěji používané vitamíny v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol, z ostatních jsou to biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin. Nepostradatelný pro růst explantátových kultur je především thiamin.

Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo jsou využívány přímo k syntéze proteinů. Přítomnost některých aminokyselin v médiu může stimulovat růst explantátů, proto se aminokyseliny do živných médií dodávají zejména v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Do živných médií se dusík v organické formě dodává ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát), často se používá také L-glutamin, L-asparagin a glycin.

Růst explantátové kultury je možné stimulovat přidáním organických extraktů. Mezi takové extrakty patří protein hydrolyzát, kokosové mléko, sladový extrakt, banánový extrakt, pomerančová a rajčatová šťáva. Jejich použití se však příliš nedoporučuje pro jejich nedefinovatelné složení.

Nejčastěji používanou látkou pro zpevnění média je agar. Dalšími látkami pro zpevnění média jsou syntetické látky Phytigel a gerlit.

Velmi důležitou součástí kultivačních médií jsou růstové regulátory. Rostlinné hormony jsou přirozené i syntetické regulátory růstu. Přirozené regulátory jsou syntetizovány rostlinou samotnou (fytohormony). Rostlinný hormon je organická sloučenina syntetizovaná v jedné části rostliny a translokovaná do části jiné, kde vyvolává fyziologickou reakci. Přirozené i syntetické růstové regulátory rozlišujeme na regulátory povahy stimulační (stimulátory) a povahy inhibiční (inhibitory). Jejich působení na rostlinu však může být i

opačné, např. stimulátor ve vyšší koncentraci může inhibovat, naopak inhibitor ve velmi nízké koncentraci může působit stimulačně. Význam regulátorů rostlinného růstu nabývá na významu především v souvislosti s rozvojem genového inženýrství a metod kultivace *in vitro*. Růstové látky (stimulátory) lze rozdělit do tří základních skupin: auxiny, cytokininy a gibereliny; kyselina abscisová se řadí mezi zábranné látky (inhibitory). Mezi regulátory rostlinného růstu patří také etylen. Látky jako např. brassinosteroidy, kyselina jasmonová, polyaminy, oligosacharidy, turgoriny, benzolinon a další patří mezi látky s růstově regulačním působením [4].

Auxiny stimulují v kultivačním médiu růst kalusu a buněk. Jejich aplikace stimuluje tvorbu adventivních kořenů na segmentech stonků i u explantátů. Látky auxinové povahy jsou významným prostředkem pro vyvolání somatické embryogeneze a jsou spolu s cytokininy základní složkou médií pro explantátové kultury. Nejčastěji používanými auxiny jsou kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) a kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA). S výjimkou IAA se jedná o syntetické látky.

Cytokininy v kultivačním médiu stimulují buněčné dělení a tvorbu axilárních prýtů. Důležitou schopností cytokininů v interakci s auxinem je iniciace diferenciací pupenů a kořenů v explantátových kulturách (u řady rostlinných druhů). Pro růst explantátové kultury a tvorbu kořenů a prýtů (organogenezi) není rozhodující pouze koncentrace jednotlivých hormonů, ale zejména jejich vzájemný poměr. Tento poměr, vedoucí k morfogenezi, je závislý na druhu rostliny, kultivaru a explantátu. Při vysokém poměru auxinu k cytokininu je stimulována iniciace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace tvorby kalusu. Naopak, je-li tento poměr nízký, dochází k indukci tvorby adventivních a axilárních prýtů. Cytokininy jsou využívány v rostlinných biotechnologiích jako složka kultivačních médií při odvozování a udržování rostlinných explantátových kultur a dále při regeneraci rostlin *in vitro*. Při indukci somatické embryogeneze bývají pouze doplňující složkou média. Více se uplatňují při kultivaci vyvíjejících se somatických embryí a hrají klíčovou úlohu při vytváření apikálního meristému u somatických embryí. Mezi cytokininy používané v kultivačních médiích patří benzylaminopurin (BAP), 6-dimethylaminopurin (IPA), furfurylaminopurin (kinetin) a zeatin. Kinetin a BAP patří mezi syntetické cytokininy [4].

Podobně jako auxiny i gibereliny stimulují dlouhivý růst. Na rozdíl od auxinů se tento účinek týká pouze nadzemních částí rostlin. Růst kořenů gibereliny neovlivňují. Kromě elongace stimulují gibereliny také buněčné dělení. V důsledku jejich působení se zvětšuje velikost i počet buněk. Dělení je stimulováno v přechodu z fáze G1 do S a fáze S je obvykle zkrácena. Mezi gibereliny patří GA<sub>3</sub>, GA<sub>7</sub>. Pro většinu explantátových kultur nejsou tyto látky nezbytné [4].

Kyselina abscisová (ABA) způsobuje v rostlinných buňkách inhibici růstu, navozuje dormanci pupenů a semen. Exogenně aplikovaná ABA působí inhibičně na klíčení semen u řady rostlin. Její hladina se v semenech snižuje při výstupu z dormance účinkem nízkých teplot, resp. světla. ABA nepůsobí přímo na indukci somatické embryogeneze, ale její nedostatek během vývinu somatických embryí je příčinou četných abnormalit a sníženého procenta rostlinek, jež se z nich dále vyvíjejí. Za předpoklad pro dokonalý vývin somatických embryí a jejich další vývin v rostliny je u jehličnanů považováno synergické působení zvýšeného osmotického tlaku média a ABA. ABA je důležitá pro maturaci somatických embryí. [3], [4].

Etylen je jediný dosud známý plyný hormon. Jeho plyný charakter je příčinou řady odlišností ve srovnání s ostatními fytohormony. Nejvýraznějším účinkem etylenu je stimulace dozrávání některých plodů. V důsledku působení velmi nízkých koncentrací etylenu je inhibován dlouhivý růst a stimulován růst radiální. Rovněž růst kořenů je etylenem silně inhibován [4].

Látky s růstově regulačním působením nejsou řazeny mezi fytohormony z důvodu jejich výskytu ve vyšších koncentracích, než je tomu obvyklé pro hormonální látky. Brassinosteroidy významně zvyšují rezistenci rostlin ke stresům; po jejich aplikaci rostliny překonávají např. sucho nebo nízkou teplotu. Polyaminy (PA) způsobují v systémech *in vitro* růstovou stimulaci, dochází k intenzivnímu buněčnému dělení. PA hrají významnou úlohu v obraně rostlin proti stresům. Je to dáno zejména jejich protektivním účinkem na membrány a na DNA. Interakce DNA s PA vede ke stabilizaci DNA vůči denaturaci. Podobně reagují PA se záporně nabitými skupinami membrán, a tím je stabilizují. Glukosaminové oligosacharidy se účastní odezvy rostlin na napadení patogeny. Aktivují syntézu fenylalaninamoniaklázy (PAL), klíčového enzymu syntézy fenolických obranných látek, fytoalexinů a syntézu stresového hormonu etylenu [4].

Jednou ze základních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility po celý průběh kultivace. Z tohoto důvodu je velmi důležitá sterilita materiálu používaného jako explantát, sterilita kultivačního média a sterilita prostředí. Při nedodržení sterility dochází ke kontaminaci kultur plísněmi či bakteriemi.

Kultivační médium se většinou připravuje ze zásobních roztoků jednotlivých složek média. Doba uchování jednotlivých složek média je různá. Makroelementy lze uchovávat po dobu několika týdnů, mikroelementy až jeden rok. Zásobní roztoky vitamínů lze uchovávat po dobu 2-3 měsíců, kdy je nutné je obměnit. V případě uchování vitamínů v mrazničce při teplotě -20 °C je jejich použití neomezené.

### 5.1.2 Metody získávání explantátových kultur

Vývoj rostlin v podmínkách *in vitro* je možné rozdělit do čtyř fází. V první fázi dochází k odvození sterilní kultury – primokultury, které spočívá v odebrání vhodného explantátu, jeho sterilizaci a kultivaci na živném médiu. Úspěch odvození sterilních kultur dřevin a růst explantátů je ovlivněn obdobím roku, kdy je explantát odebrán. Změny teploty, délky dne, hladiny osvětlení, dostupnosti vody v průběhu roku ovlivňují obsah sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlinách, a mají tak vliv i na růst explantátů odvozených z matečných rostlin.

Odvozený materiál je následně využíván ve druhé fázi – proliferační. Cílem proliferační fáze je dosáhnout vysokého koeficientu množení a získat tak co největší počet nových explantátů cestou somatické embryogeneze, popř. tvorbou adventivních pupenů aj. Proliferační fáze může být opakována nebo může následovat třetí fáze.

Třetí fáze vývoje rostlin v podmínkách *in vitro* je spojena se zakořeňováním. Zakořeňování může probíhat *in vitro* nebo *in vivo*. Nevýhodou kořenů vytvořených v podmínkách *in vitro* je častá absence kořenového vlášení a také jejich křehkost, která způsobuje, že se při přenosu rostlin do půdy lámou. Tvorbu kořenů ovlivňují nejen růstové regulátory, ale i makroelementy, mikroelementy, světlo, teplota atd. U většiny druhů indukce tvorby kořenů vyžaduje větší přítomnost auxinu.

Poslední, čtvrtá fáze, představuje převod rostlin z kultury *in vitro* do podmínek *in vivo*. Zakořeňování *in vivo* představuje zakořeňování prýtů odvozených *in vitro* v nesterilních podmínkách na substrátech jiných, než jsou kultivační média (např. perlit, vermikulit, směsi obsahující písek, rašelinu a čedičovou vatu atd.) [3].

V zemědělství se explantátové kultury komerčně využívají především v produkci okrasných druhů rostlin, k množení ovocnářsky významných druhů rostlin a zeleniny, ozdravování a produkce bezvirozního rostlinného materiálu, rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd, uchování genobanky jednotlivých druhů, kultivarů atd. Explantátové kultury nacházejí stále větší uplatnění ve šlechtitelských programech [3].

## 6 Křídlatka japonská (*Reynoutria japonica*)

Patří do čeledi *Polygonaceae* – rdesnovité. Je charakterizována jako vytrvalá, 1-2,5 m vysoká bylina s přímou a dutou lodyhou, která je obvykle červeně skvrnitá, nahoře větvená. Listy má světle zelené, vejčité, na vrcholu zúžené v dlouhou špičku, na bázi uťaté. Květenstvím je lata mnohokvětých lichoklasů. Květy malé, bílé až nazelenalé.. Plodem je černá nažka [5].

Vyskytuje se podél komunikací, vodních toků, na ruderalních stanovištích, dále také v parcích a zahradách, kde je často pěstována. Kvete od července do září [5].



**Obrázek 2:** Křídlatka japonská [5]

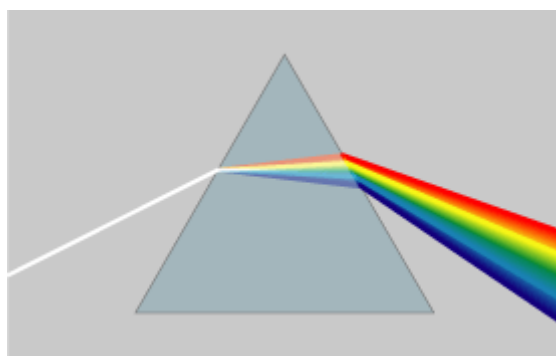
### Zajímavosti

Jedná se o nepůvodní a zdomácnělý druh květeny České republiky původem z Asie. Do Evropy byla dovezena jako okrasná rostlina v 19. století z Japonska a na naše území se dostala koncem 19. století. Křídlatka se rychle šíří a je jedním z našich nejznámějších invazních druhů. Postupem času došlo k jejímu rozšíření z parků a zahrad a dnes ji můžeme nalézt po celém území. Rozmnožuje se vegetativně a „dálnicí“ šíření jsou hlavně vodní toky. Vytváří husté porosty, které vytlačují původní rostlinstvo. Křídlatka díky svému rychlému růstu tvoří velké množství biomasy a je jednou z rostlin, o které se uvažuje pro energetické využití. Dokonce se provádějí studie ohledně využití křídlatek k odstraňování rizikových prvků (např. Pb, Cr, Co, As, Hg, Mn) z kontaminované zeminy [5].

Luhováním listů křídlatky ve vodě nebo alkoholu lze získat ochranný prostředek proti plísním. Obsahuje tzv. protykin, který pozitivně ovlivňuje cévy a srdce, snižuje riziko srdečního infarktu. Zároveň je fytoestrogenem, jenž u žen v menopauze zmírňuje návaly, pocení a změny nálad a u mužů je účinný při problémech s prostatou. Je to rovněž antioxidant [6].

## 7 Spektrometrie

Zakladatelem spektrometrie je sir Isaac Newton, který pomocí optického hranolu objevil monochromatické světlo (viz. obr. 3). Také si všiml, že čím čistější monochromatické světlo získává, tím slabší je jeho intenzita. Tato skutečnost je pravdou, kterou překonaly až lasery a synchrotrony. První spektrometr vytvořili Kirchhoff a Bunsen v roce 1860 [7].



**Obrázek 3:** Rozklad světla pomocí optického hranolu [8]

Na spektrometrii se lze dívat jako na interakci záření s hmotou. Atom nebo molekula mohou záření pohltit (absorpce) nebo naopak uvolnit energii ve formě záření (emise) či záření pohltit a po čase jej opět emitovat (fluorescence a fosforescence). Základní fyzikální vlastností látek je, že se jedná o záření určitých specifických vlnových délek. Absorbované nebo emitované spektrum není spojité, ale skládá se z mnoha linií, které jsou specifické pro každou látku. Neexistují dvě chemicky odlišné látky mající stejné absorpční nebo emisní spektrum [7].

V kapalně a pevné fázi pozorujeme spektra pásová. V plynné fázi mají spektra podobu separovaných linií v případě molekul sdružených do pásů. Ve vzdálené infračervené oblasti odpovídá každá linie změně rotace molekuly. Ve střední a blízké infračervené oblasti změně vibrace a rotace molekuly. Ve viditelné a ultrafialové oblasti spekter dochází k elektronovým změnám (přeskokům z orbitalů různých energií) ve vnějších slupkách molekulových a atomových orbitalů, v oblasti rentgenového záření ke změnám ve vnitřních slupkách atomů. Radioaktivní záření gama vede k přeskokům jaderných částic mezi jednotlivými energetickými hladinami jádra [7].

Spektrometrie se využívá především v analytické a forenzní chemii.

Rozdělení typů spektrometrii:

- Atomová
- Rentgenová
- Ultrafialová a viditelná
- Luminiscenční
- Infračervená
- Ramanova

## 7.1 Ultrafialová a viditelná spektrometrie

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200–800nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra [9].

V ultrafialové a viditelné spektrometrii se používají 2 základní veličiny a to transmittance a absorbance. Množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem, popisuje veličina transmittance.

Je definována jako:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4.1)$$

$I$  ... intenzita světla, které prošlo vzorkem

$I_0$  ... intenzita světla, které do vzorku vstoupilo [9].

Absorbance je veličina, která udává, jak mnoho světla bylo pohlceno měřeným vzorkem.

Absorbanci můžeme definovat na základě transmittance jako:

$$A = -\log T. \quad (4.2)$$

Častěji bývá však vyjadřována pomocí Lambertova-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c. \quad (4.3)$$

$\varepsilon$  ... molární absorpční koeficient

$l$  ... tloušťka absorbující vrstvy

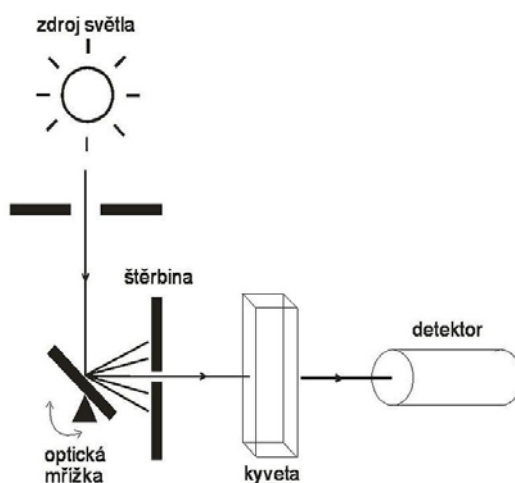
$c$  ... látková koncentrace [9].

### Spektrofotometr

Slouží k měření absorbance a transmittance. Jde o přístroj u kterého je možné libovolně nastavit vlnovou délku monochromatického světla nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek.

Skládá se ze čtyř částí:

- zdroj světla
- monochromátor
- kyveta
- detektor



Obrázek 4: Schéma uspořádání spektrofotometru [10]



## **Zdroj světla**

Jako zdroj záření se používá wolframová a halogenová žárovka pro viditelnou oblast a deuteriová lampa pro oblast ultrafialovou. Wolframová žárovka se využívá pro rozsah vlnových délek 350–3000nm. Emitovaná energie je úměrná čtvrté mocnině přiloženého napětí. Z důvodů velké citlivosti na kolísání napětí musí být dobře stabilizováno. Halogenová žárovka má asi dvojnásobnou životnost než wolframová. Její spektrum zasahuje až do ultrafialové oblasti. Využívá se výhradně v moderních spektrofotometrech. Deuteriová lampa produkuje kontinuální ultrafialové spektrum záření v rozsahu 160–375nm [9].

## **Monochromátor**

Jedná se o zařízení, které vstupující záření rozdělí na řadu monochromatických paprsků, z nichž je vybrána požadovaná vlnová délka. Skládá se ze vstupní štěrbinu pro přiváděný paprsek, disperzního prvku a výstupní štěrbinu pro paprsek vybrané vlnové délky. Jako disperzní prvek jsou používány hranoly a mřížky. Vlnová délka se pomocí monochromátoru může měnit kontinuálně [9].

## **Kyveta**

Vzorek (roztok) je uložen v kyvetě, kterou prochází monochromatické světlo. Kyvety se v přístroji umísťují do tzv. kyvetátoru, který zajišťuje jejich přesnou polohu popř. teplotu. U moderních spektrofotometrů je možno do kyvetátoru vložit několik kyvet najednou.

Jako vzorky

## **Detektor**

Světlo které projde kyvetou se vzorkem po sléze dopadá na detektor, kde dojde pomocí převodníků k vyhodnocení a srovnání s intenzitou světla procházejícího slepým vzorkem. Přesnost měření ovlivňuje doba po kterou se absorbance měří. Čím je delší, tím přesnějšího výsledku bude dosaženo. Výjimkou je měření absorbance fotocitlivých látek, u kterých po čase dojde k vyblednutí.

Jako detektory se používají fotonásobiče, polovodičové fotoelektrické články, diodová pole a CCD detektory [9].

## 8 Oxidativní stres

Fungování živých systémů je závislé na energii. Tu získávají aerobní organizmy oxidací molekul glukózy a mastných kyselin. Její nebezpečí spočívá v uvolňování elektronů, které pak reagují s jinými molekulami, dokud nedosáhnou svého konečného akceptoru. Pokud je porušena rovnováha mezi vznikem a odstraňováním aktivních forem kyslíku, neboli volnými kyslíkovými radikály, tak nastává oxidativní stres [11] [12].

Jako volný radikál se definuje molekula nebo atom, který obsahuje ve své poslední vrstvě (valenční sféře) nepárový elektron. Mezi nejvíce zkoumané volné radikály patří kyslík, který tvoří tzv. kyslíkové volné radikály. Když je samotná molekula kyslíku ( $O_2$ ) oxidačním činidlem, je relativně nereaktivní, ale po přidání elektronu může z molekulárního kyslíku vzniknout celé spektrum reaktivních forem kyslíku.

Zdrojem volných radikálů v buňce je celá řada redoxních reakcí, které se nejčastěji nacházejí v energeticky aktivních centrech, jako jsou mitochondrie (redukce  $O_2$ ) a chloroplasty (fotolýza vody). V těchto centrech se odehrávají především reakce spojené s elektronovým transportem, při nichž může vznikat singletový kyslík ( $^1O_2$ ), který následně stimuluje tvorbu dalších ROS (peroxid vodíku, superoxid, hydroxylový radikál). Tyto vznikající volné radikály jsou nebezpečné pro celý organismus hlavně z důvodu jejich vysoké schopnosti reagovat s lipidy, proteiny a nukleovými kyselinami [13].

ROS můžeme zjednodušeně rozdělit na volné (superoxid, peroxy, alkoryl) a vázané (peroxid vodíku, ozón, kyselina chlorná a další). Všechny tyto radikály mohou v rostlinách vznikat různými způsoby. Mohou přirozeně tvořit při fotosyntéze či respiraci nebo se produkují při negativním působení nějakého abiotického či biotického faktoru.

ROS vznikají hlavně jako vedlejší produkt metabolických procesů, ale hrají v rostlinách významnou roli při signalizaci stresu, podílejí se na obranných procesech a případně i na buněčné smrti (apoptóze). Kromě toho, že se při obraně ROS podílejí na strukturním zesílení buněčné stěny, mohou také mít eliminační účinek na patogenní organismus [14], [15], [16], [17], [18].

Všeobecně volné radikály, mají na rostlinný organismus převážně škodlivý vliv. Z toho důvodu si rostliny musely vytvořit obranné antioxidační mechanismy, díky nimž mohou odolávat vznikajícímu oxidativnímu stresu. Tyto obranné systémy eliminují volné radikály nejčastěji dvěmi základními způsoby, enzymaticky a neenzymaticky. Mezi neenzymaticky působícími antioxidanty řadíme  $\beta$ -karoten, askorbát, redukovaný glutathion a  $\alpha$ -tokoferol. Do skupiny enzymových antioxidantů se řadí superoxiddismutasa, peroxidasa, katalasa a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Halliwell-Assadova reakce) [19], [20], [21].

Mechanismy podílející se na antioxidačních reakcích se rozdělují do dvou hlavních skupin. Prvním typem obranných mechanismů se rostliny brání proti vystavení stresu („avoidance mechanisms“). Při tomto typu obrany si rostliny vytváří mechanické bariéry, které ochraňují vnitřní část organismu před stresem. Tyto bariéry mají především pasivní a dlouhodobý charakter (silná impregnace buněčných stěn, tvorba kutikuly na povrchu listů, rezervoáry vody). Do druhé skupiny obranných mechanismů spadá tzv. aktivní ochrana („tolerance mechanisms“). Ty omezují nebo zcela odstraňují negativní dopad stresového faktoru na rostlinnou buňku a její intracelulární obsah. Při aktivaci tohoto typu mechanismu se obvykle spouští celá škála obranných procesů, které se obecně nazývá stresová reakce. Průběh a obzvláště výsledek těchto stresových reakcí závisí na druhu stresového faktoru, době expozice, jeho intenzitě a hlavně na zdravotním stavu stresované rostliny [3].

## 8.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

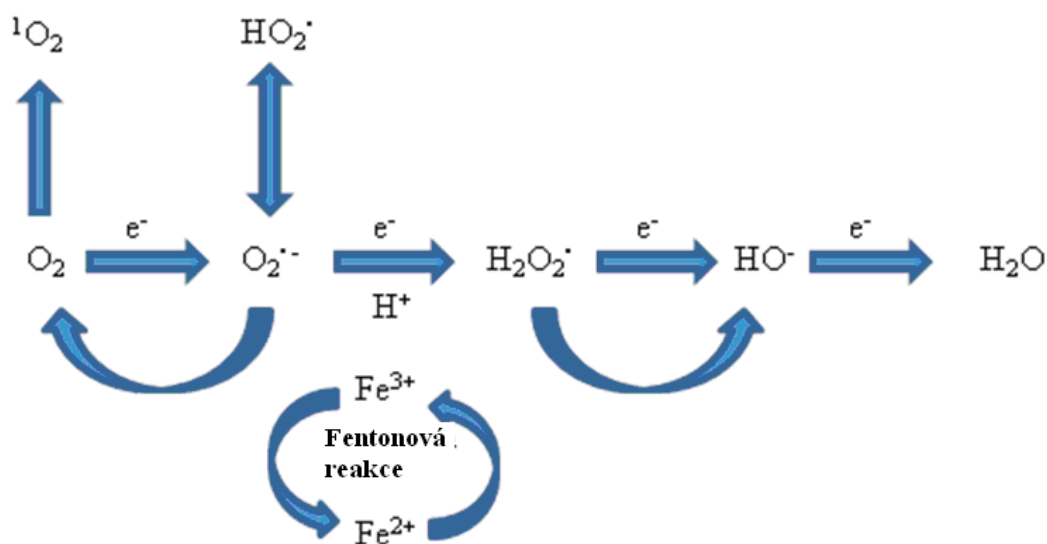
Za normálního stavu je v rostlinách udržována nízká hladina ROS. Jsou-li však vystaveny stresovým podmínkám, které naruší jejich buněčnou rovnováhu, dojde k výraznému zvýšení koncentrace těchto volných radikálů. Jejich přítomnost v organismu nemusí vždy hrát negativní roli. Mohou v buňkách či pletivech sloužit jako signální molekuly, které zahajují genovou expresi. Dále se také podílejí na ochraně rostlin při napadení patogenem, kdy jsou produkovány v nadměrném množství, aby patogena eliminovaly, případně sami sebe zničily i s patogenním organismem (apoptóza) [22], [12].

ROS mají celou řadu negativních účinků, ale mezi ty nejvýznamnější se řadí reakce s nenasycenými mastnými kyselinami, kdy dochází k peroxidaci esenciálních membránových lipidů nacházejících se v plazmalemě či intracelulárních organelách. Při peroxidaci plazmalemy může dojít k úniku cytosolu, což by mohlo vést až k buněčné smrti. Mezi další jejich negativní funkce patří také inaktivace enzymů, oxidace proteinů a poškození nukleových kyselin [23].

## 8.2 Neenzymatická produkce reaktivních forem kyslíku

Přítomnost molekulárního kyslíku ( $O_2$ ) je nezbytná pro existenci všech aerobních organismů na Zemi. Jejich jedinými producenty jsou rostliny a cyanobakterie, jež ho tvoří v průběhu fotosyntézy [24].

Atmosférický kyslík se od ostatních tím, že je v základní stavu biradikální, což znamená, že ve své molekule obsahuje dva nepárové elektrony. Sám o sobě je tento kyslík málo reaktivní, pro svoji aktivaci musí získat potřebné množství energie, aby došlo k obrácení spinů jednoho z elektronů, čímž vznikne singletový kyslík ( $^1O_2$ ) nebo k jednoelektronové redukci za vzniku superoxidu peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu a nakonec vody (obr. 5).



**Obrázek 5:** Schéma redukce molekulárního kyslíku v buňce [13]

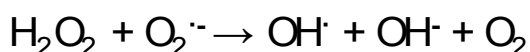
Pro celkovou redukci atmosférického kyslíku je potřeba 4 elektronů, které jsou doprovázeny postupnou jedno až tříelektronovou redukcí, při níž vzniká jako meziprodukt superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a celá redukce je zakončena tvorbou molekuly vody. Pro první reakci, v tomto řetězci, je potřeba iniciační energie, ostatní kroky už probíhají samovolně [13], [25].

Při první redukci vzniká superoxidového anionradikálu ( $O_2^{\bullet -}$ ). Superoxid je poměrně málo reaktivní forma kyslíku s krátkým poločasem života, přibližně 2-4  $\mu s$ . Dobře prochází

přes biomembrány a v buňce může fungovat nejen jako oxidant, ale také i jako reduktant. Mezi látky, které nejčastěji oxiduje, patří síra, askorbát, NADPH, některé aminokyseliny. Na druhou stranu redukovat může cytochrom C, chinony a komplexy přechodných kovů [13], [25], [26].

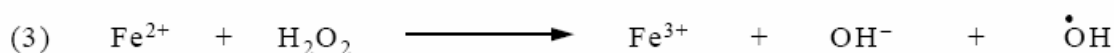
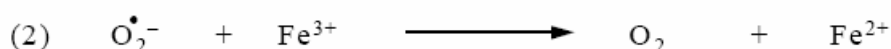
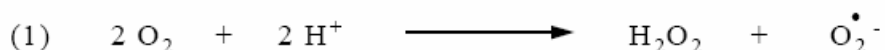
Ve druhém kroku redukce se tvoří peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), jehož molekula je nestabilní s poločasem života 1 ms. Vzniklá molekula peroxidu vodíku může být a) redukována na vodu a kyslík za přítomnosti katalasy; b) využita jako substrát peroxidasy; c) eliminována v Halliwellově-Assadově reakci [13], [27].

Ve třetím kroku redukce molekulárního kyslíku může vzniknout nejreaktivnější forma kyslíku, kterou je hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\bullet$ ). Ten může vznikat v tzv. Haberově-Weissově (viz. obr. 6) reakci přeměnou peroxidu vodíku a superoxidu [26] [28].



**Obrázek 6:** *Haberova-Weissova reakce*

Reakce je bohužel příliš pomalá a nevytváří dostatečné množství hydroxylového radikálu, proto se do této reakce zapojuje také Fentonova reakce, v níž se oxidují přechodné kovy (železnaté a měďné ionty; viz obr. 7) [29].



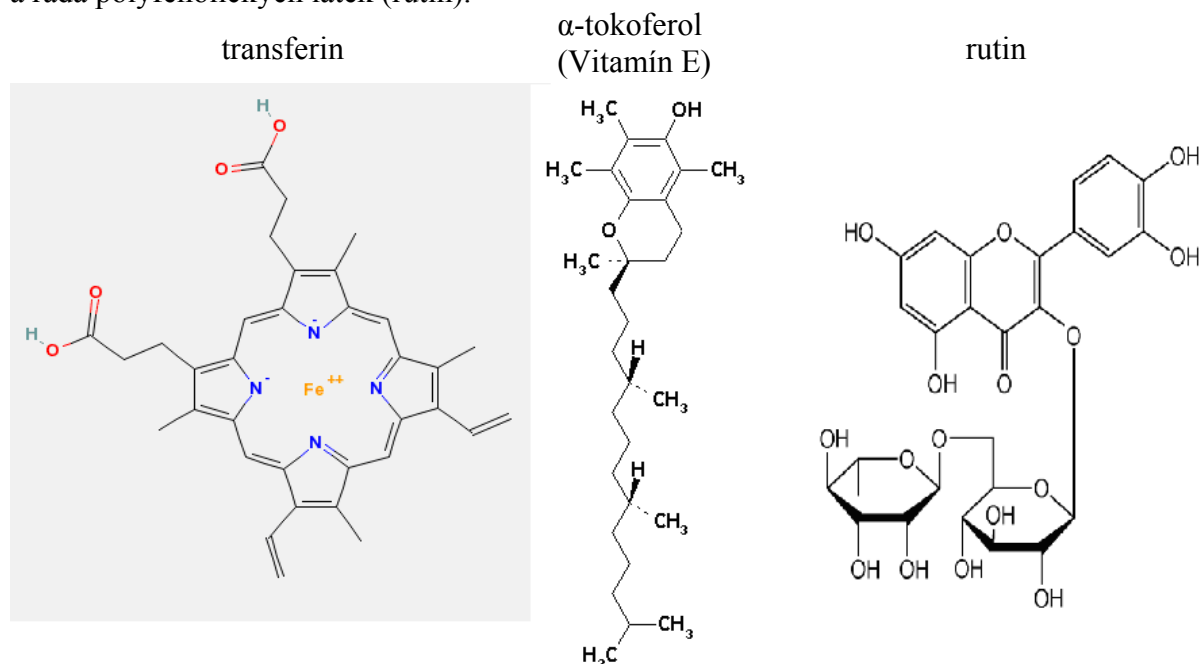
**Obrázek 7:** *Fentonova reakce*

Redukce oxidovaných iontů zpět na jejich redukováný stav se děje pomocí superoxidového radikálu a vzniklý hydroxylový radikál může zahajovat další radikálové řetězové reakce s organickými molekulami, což může mít pro organismus negativní dopad. Při těchto reakcích dochází k peroxidaci lipidů, inaktivaci enzymů či poškození DNA a RNA [27].

## 9 Antioxidanty

Proti působení reaktivních forem kyslíku v organismech existuje řada obranných mechanismů, kterých se zúčastňuje řada látek, tzv. antioxidantů. Termín antioxidant se používá v mnoha významech, obecně lze antioxidanty definovat jako jakékoli přírodní nebo syntetické látky, které pokud jsou přidány k potravinám, nebo jiným produktům, mají schopnost zabránit jejich autooxidaci. Jsou to látky významně chránící biomolekuly před poškozením způsobeným reaktivními formami kyslíku či dusíku i přesto, že jsou přítomny v nižší koncentraci než biomolekuly, které mají chránit. Na základě této definice lze antioxidanty rozdělit do dvou hlavních skupin – na antioxidanty preventivní (zabraňují vzniku řetězových radikálových reakcí) a antioxidanty přerušující již běžící řetězové radikálové reakce.

K preventivním antioxidantům se řadí antioxidační enzymy (superoxid dismutasa, katalasa, peroxidasy), chelátory přechodných kovů (např. EDTA), kovy vážící proteiny (transferin, ferritin, ceruloplasmin, hemoproteiny), či celá řada tzv. nízkomolekulárních antioxidantů (z chemického hlediska jde o různorodou skupinu látek fenoly, thioly, heterocykly). Nejdůležitějšími nízkomolekulárními antioxidanty jsou askorbát, urát, tokoferol a řada polyfenolických látek (rutin).



Obrázek 8: Antioxidanty [30], [31], [32]

Míra schopnosti organismu vzdorovat oxidačnímu stresu je určena jednak množstvím v ní přítomných antioxidantů, jednak jejich druhem. Parametr, který poukazuje na schopnost odolávat oxidačnímu stresu, je označován jako antioxidační kapacita a udává celkovou účinnost všech antioxidantů v organismu.

## 9.1 Metody stanovení antioxidační aktivity

Metod pro stanovení antioxidační aktivity je mnoho, protože antioxidanty působí různými mechanismy. V metodách pro stanovení antioxidační aktivity se často využívá reakce antioxidantů s radikály či přechodnými kovy.

Postupy pro stanovení antioxidační aktivity jsou založeny na různých principech. Jejich součástí je především spektrofotometrické měření na různých vlnových délkách, fluorometrie a chromatografie.

### 9.1.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Metody spočívající v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do reakční směsi přidávány. Z chemického hlediska jde o radikály kyslíkové nebo syntetické stabilní. Zvláštní skupinu tvoří metody testující schopnost inhibovat nebo zpomalovat lipidovou peroxidaci [33].

#### Metoda Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

Využívá činidel, která iniciační akcí jiné látky přecházejí ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku se redukuje, a tím odbarvuje. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření této kvality vzorku bylo standardní, stanovuje se shodným postupem TEAC v přítomnosti pouhého askorbátu, Troloxu, gallátu, epikatechinu nebo jiných klasických antioxidantů [34].

Nečastěji používaným prekursorem radikálů je tzv. ABTS, tj. 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát, iniciátorem, který ji přeměňuje na modrozelený radikál ABTS<sup>•+</sup>, je látka AAHP, tj. 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrolorid, ale také peroxid vodíku, ferrokyanid, persíra nebo peroxidasa z křenu ve směsi s peroxidem vodíku [34].



**Obrázek 9:** Kyvety – metoda TEAC

#### Metoda 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antioxidační aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpicrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu. Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance nebo High Performance Liquid Chromatography – HPLC. Použití HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je

výhodné zvláště u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometre zabarvení vzorku eliminuje [33].



**Obrázek 10:** Kyvety – metoda DPPH

### **Metoda Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)**

Spočívá ve vytvoření peroxylového radikálu fykoeritrinu, a to jeho oxidací činidlem ABAP (2,2'-azobis-2-methyl-propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku [34].

### **Metody založené na vychytávání OH-radikálů**

Při těchto metodách jsou OH-radikály generovány různými postupy (Fejtonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou syntetických derivátů). Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající OH snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání OH salicylovou kyselinou [33].

### **Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu**

K produkci je užívána neenzymová reakce. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky při 550–560nm. V testech UV může být modř nahrazena syntetickým formazanovým barvivem, které je vzhledem k dobré rozpustnosti vhodnější [33].

### **Metody lipidově peroxidační**

Provádějí se v pufrovaných modelových systémech obsahujících nenasycené mastné kyseliny a testovaný vzorek. Často se přidává homogenát živočišné tkáně, např. jater nebo mozku a lipidová peroxidace se v ní iniciuje tetrachlormetanem nebo peroxidem. Je možné použít separovaných mikrotomů a iniciace lipoperoxidačních alterací směsí NADPH (Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) a železnaté soli nebo jinými systémy [34].

### **Metody založené na detekci oxidačního poškození organismu**

Jedná se o nákladné a časové náročné metody, neboť se u pokusných zvířat vyvolává experimentální oxidační stres a současně nebo následně se v různých dávkách podává testovaný vzorek. Kritérii oxidačního poškození jsou např. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin v moči, karbonylové proteiny v krvi, hydroperoxydy a konjugované dieny v krvi, F2-isoprostany a etan + pentan ve vydechaném vzduchu [34].

### 9.1.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky [33].

#### Metoda Ferric Reducing Ability Plasma (FRAP)

Tato metoda je založena na redukci železitých komplexů jako je TPTZ (2,4,6-tripidyl-S-triazin), ferrokyanid aj. které jsou téměř bezbarvé a po redukci a eventuální reakci se dalším činidlem vytváří barevné produkty, jakým může být např. berlínská modř, jejichž absorpčním maximem je vlnová délka 593nm. Reakce je nespecifická. Každá vedlejší reakce s nižším redoxním potenciálem jako  $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}/\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$ , při daných reakčních podmínkách podporuje redukci  $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$  [34], [35].

Metoda má svá omezení spočívající v tom, že měření probíhá při velmi nízké hodnotě pH (3,6), dále nejsou zachyceny polyfenolické látky reagující s komplexem pomalu [36].



Obrázek 11: Kyvety - metoda FRAP

#### Cyklická voltametrie

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit cyklickou voltametrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku a jeho anodického proudu. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity [33].

#### Metoda vysoce účinné kapacitní chromatografie (HPLC)

Elektroaktivní látky je možno velmi přesně a citlivě detekovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem při kterém oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Při analýze neruší zbarvení směsí, ale je nutné dodržet vysokou čistotu reagentů v mobilní fázi [33].

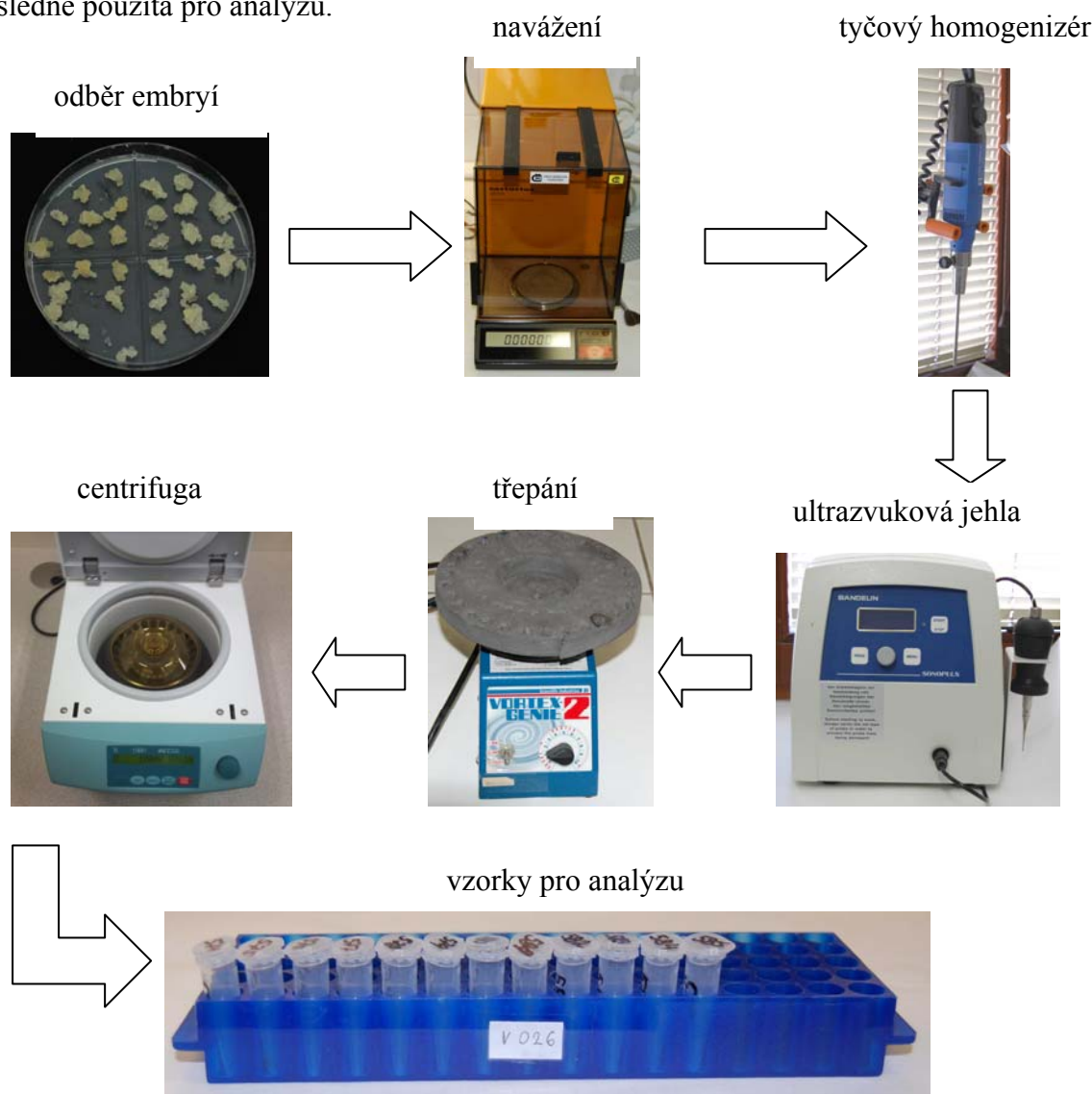


# 10 Použité materiály a metody

## 10.1 Příprava vzorku

Vzorky kultur byly odebrány pro analýzu ve sterilních podmínkách. Z Petriho misky (v případě explantátové kultury křídlatky japonské) bylo odebráno definované množství embryí (asi 400mg). Embrya byla nejdříve omyta v 0.2M roztoku ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). Dále byla omyta ve sterilní vodě, osušena v buničině, vložena do mikrozkušavky a zvážena.

Do takto odebraných vzorků kultur v mikrozkušavkách se přidalo 1 000 $\mu$ l 0,2M fosfátového pufru o pH 7. Ty se vložily do kádinky s ledem a pomocí tyčového homogenizéru ULTRA-TURRAX T8 (IKA, Germany) a ultrazvuku se embrya homogenizovala po dobu dvou minut, dále následovala extrakce pomocí Vortex–2 Genie (Scientific Industries, New York, USA) při 4 °C po dobu 30 min a nakonec byla mikrozkušavka s homogenizátem centrifugována pomocí Universal 32 R centrifugy (Hettich–Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Germany) při 16 400 rpm a 4 °C. Po dokončení byla odebrána kapalina nad sedimentem, která byla následně použita pro analýzu.



Obrázek 12: Schéma přípravy vzorků

## 10.2 Chemikálie

ABTS (2,2.-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát), Potassium persulfát, TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (hexahydrát chloridu železitého), octan sodný, kyselina octová, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), DMSO (dimethylsulfoxid), TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromen-2-karboxylová kyselina), ethanol 96% od společnosti Sigam-Aldrich, glutathione redukovaný sacharóza (GSH),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (hydrogenfosforečnan draselný), thiamin,  $\text{Cd}(\text{NO})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tetrahydrát dusičnanu kademnatého), hydrogefosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný. Plant Agar, MS medium od společnosti Duchefa Biochemie. Zásobní roztoky standardů (koncentrace  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při  $4^\circ\text{C}$ . Pracovní roztoky byly ze zásobního připravovány každý den nové. Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěná pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18 M $\Omega$ ).

## 10.3 Stanovení svěží hmotnosti

Pro stanovení hmotnosti u explantátových kultur byly použity váhy Sartorius R160P (Sartorius GmbH, Goettingen, Německo).

## 10.4 Fotografická dokumentace

Fotografie křídlatky japonské byly snímány na začátku experimentu a dále ve stanovených intervalech až do konce experimentu pomocí Olympus C-4040 ZOOM kamery (Olympus, Japonsko) s Olympus SZH 10 čočkami (zvětšení 0.7). Získané obrázky byly transportovány do osobního počítače.

## 10.5 Metody pro stanovení antioxidační aktivity

### 10.5.1 Stanovení DPPH

Pro stanovení byly použity roztoky dle autorů Stratil a kol. Pro měření byl připraven zásobní roztok DPPH ( $9,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) a pro kalibraci roztok standartu o koncentracích 0 – 5mM.

Nastavení BS-200: k 300 $\mu\text{l}$  roztoku DPPH bylo přidáno 30 $\mu\text{l}$  vzorku. Vzorek se nechal inkubovat 10 minut při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a po uplynutí této doby byla změřena absorbance při 510nm.

### 10.5.2 Stanovení TEAC

Pro stanovení byly použity roztoky dle autorů Stratil a kol. Pro měření byl připraven zásobní roztok TEAC, který obsahoval 7mmol/l ABTS a 4,95mmol/l persulfátu draselného. Následně byl roztok 100 krát zředěn a ponechán na temném místě po dobu 12 hodin. Pro kalibraci roztok standartu o koncentracích 0 – 5mM.

Nastavení BS-200: Ke 245  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku TEAC bylo přidáno 5 $\mu\text{l}$  vzorku, vše bylo promícháno a inkubováno 10 min při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Po uplynutí byla měřena absorbance při 670nm.

### 10.5.3 Stanovení FRAP

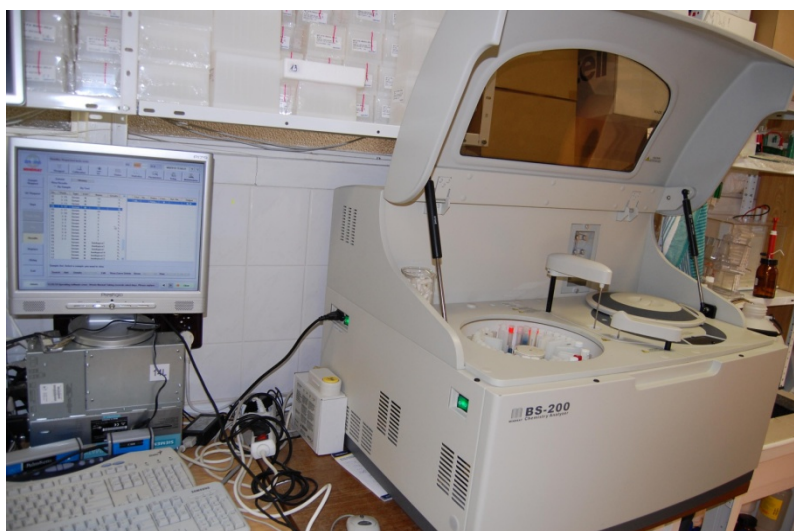
Pro stanovení byly použity roztoky dle autorů Stratil a kol. Pro měření byl připraven zásobní roztok FRAP připravený smícháním deseti objemových dílů acetátového pufru (300mM, pH 3,6) s jedním dílem roztoku TPTZ (10mM, rozpuštěno ve 40mM HCl) a s jedním dílem roztoku  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20mM). Pro kalibraci roztok standartu o koncentracích 0 – 5 mM.

Nastavení BS-200: K 245  $\mu\text{l}$  roztoku FRAP bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  vzorku. Vše bylo promícháno a inkubováno při teplotě 37°C po dobu 10 min. Po době se změřila absorbance při 578nm.

## 10.6 Přístroje

### 10.6.1 Spektrometr MINDRAY BS-200

Stolní automatický spektrometrický analyzátor pro stanovení substrátů, enzymů, elektrolytů a specifických proteinů. V této práci byl využit pro stanovení antioxidační aktivity křídlatky japonské metodou FRAP. Přístroj disponuje kotoučem pro umístění zkumavek se vzorky a nádržek s reagensiemi, dále také kruhovým kyvetátorem. Oblast kotouče se vzorky je tepelně regulována. Přenos vzorků z kotouče do kyvet zajišťuje automatická pipeta. Spektrometr je ovládán počítačem prostřednictvím dodaného softwaru.



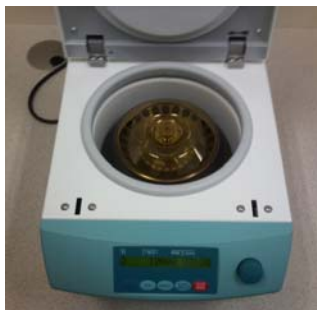
**Obrázek 13:** Přístroj MINDRAY BS-200

**Tabulka 1:** Specifikace MINDRAY BS-200 [37]

Výkon	200 fotometrických testů za hodinu, 330 testů s ISE za hodinu
počet pozic	40 chlazených na reagensie + 3 ISE
vlnové délky	340, 405, 450, 510, 546, 578, 630, 670 nm (mono/bichr.)
ISE	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$
objem dávkovaného vzorku	3 – 45 $\mu\text{l}$ , krok po 0,5 $\mu\text{l}$
objem dávkované reagensie	R1 180 – 450 $\mu\text{l}$ po 1,0 $\mu\text{l}$ , R2 30 – 450 $\mu\text{l}$ po 1,0 $\mu\text{l}$
reakční objem	180 – 500 $\mu\text{l}$
reakční teplota	37 $\pm$ 0,1°C
Rozlišení	0,001 Abs
metody měření	endpoint, kinetika, fixní čas, logit-log 4P, logit-log 5P, spline, exponent 5P, polynom, parabola
Display	LCD barevný 17"
operační systém	Windows 2000 Pro / Windows XP
Rozměry	860 x 700 x 625 mm
Hmotnost	116 kg

### 10.6.2 Centrifuga Hettich MIKRO 200

Jedná se o zařízení sloužící k separaci různých látek pomocí odstředivé síly. Na přístroji je možno nastavit rychlost otáček a doba po kterou budou vzorky odstředovány. Její využití je natolik široké, že součást vybavení téměř každé laboratoře.



Obrázek 14: Centrifuga Hettich Mikro 200

Tabulka 2: Technické údaje přístroje Hettich Mikro 200 [38]

Parametr	Hodnota
Max. kapacita	24 x 1.5 / 2.0 ml
Max. RPM	14,000/min
Max. RCF	18,626
Doba provozu	1 – 99 min., ∞

### 10.6.3 Laboratorní třepačka IKA MS 3 digital

Kompaktní malá třepačka typu Vortex pro třepání zkumavek, mikrozkušavek a titračních destiček. Chod může být buď trvalý, nebo se spouští pomocí startovací automatiky - uživatel pouze opře zkumavku o můstek a tím spustí třepání.



Obrázek 15: Laboratorní třepačka IKA MS 3 digital [39]

Tabulka 3: Technické údaje přístroje IKA MS3 digital [39]

Parametr	Hodnota
Pohyb můstku	kruhový
Frekvence pohybu	0 až 3000/min
Amplituda	4,5 mm
Ukazatel kmitů	stupnice
Časovač	1 s až 999 min.
Hmotnost	2,9kg
Krytí	IP21

# 11 Výsledky a diskuse

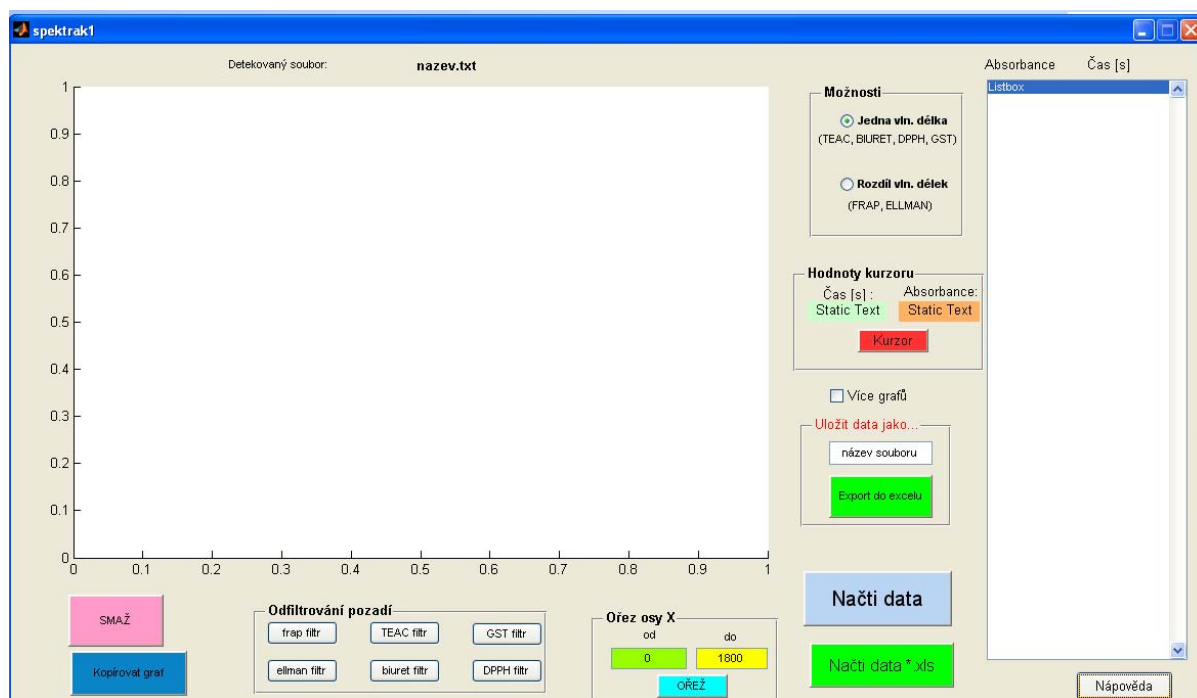
Nejdříve byl vytvořen program pro analýzu a vyhodnocení dat, které byly získány automatickým spektrometrem. V programu je obsažena řada funkcí a nástrojů potřebných k analýze. Poté následovala hmotnostní analýza, jež se zabývala studiem vlivu kademnatých iontů na explantáty křídlatky japonské. Na konec byly explantáty rostliny homogenizovány a analyzovány spektrometrem. Získaná naměřená data byla vytvořeným programem matematicky zpracována a vyhodnocena.

## 11.1 Tvorba programu pro matematickou analýzu a vyhodnocení dat

Při práci s přístrojem MINDRAY BS-200 vzniká problém pozdějšího zpracování dat tzv. postprocessingem. V jiném programu než je dodáván s výrobcem společně s přístrojem. Pro běžná měření standardními metodami a postupy postačuje většinou program jež je poskytován s přístrojem. U vědeckých pracovišť však často nastává problém, že běžně dodávaný program od výrobce nestačí. Na těchto pracovištích se často pracuje nerutinními postupy a získaná data se mohou i dále statisticky zpracovávat. Data získaná přístrojem jsou však zcela nekompatibilní s jiným softwarem než deklarovaným výrobcem. Je tedy nutné vytvořit program, který umožní pracovat i s jiným softwarem.

### 11.1.1 Program spektrak1

Tento program je realizován v programovacím jazyku MATLAB pomocí grafického prostředí GUI. Je uzpůsoben pro práci s výstupními daty přístroje MINDRAY BS-200. Součástí programu jsou i nástroje pro zpracování signálu.



Obrázek 16: Prostředí programu „spektrak1“

## 11.1.2 Funkce programu

Program má celou řadu funkcí, které je možné využít v průběhu práce s daty. Názvy funkčních tlačítek jsou pojmenovány tak, aby bylo ovládání programu co možná nejintuitivnější.

### Možnosti před načítáním

Pomocí tlačítek je možno před načítáním dat vybrat jednu ze dvou možností. Jde o volbu „jedna vlnová délka“ nebo „rozdíl dvou vlnových délek“. Tuto volbu zvolí uživatel podle toho jakou metodou byla data získána.

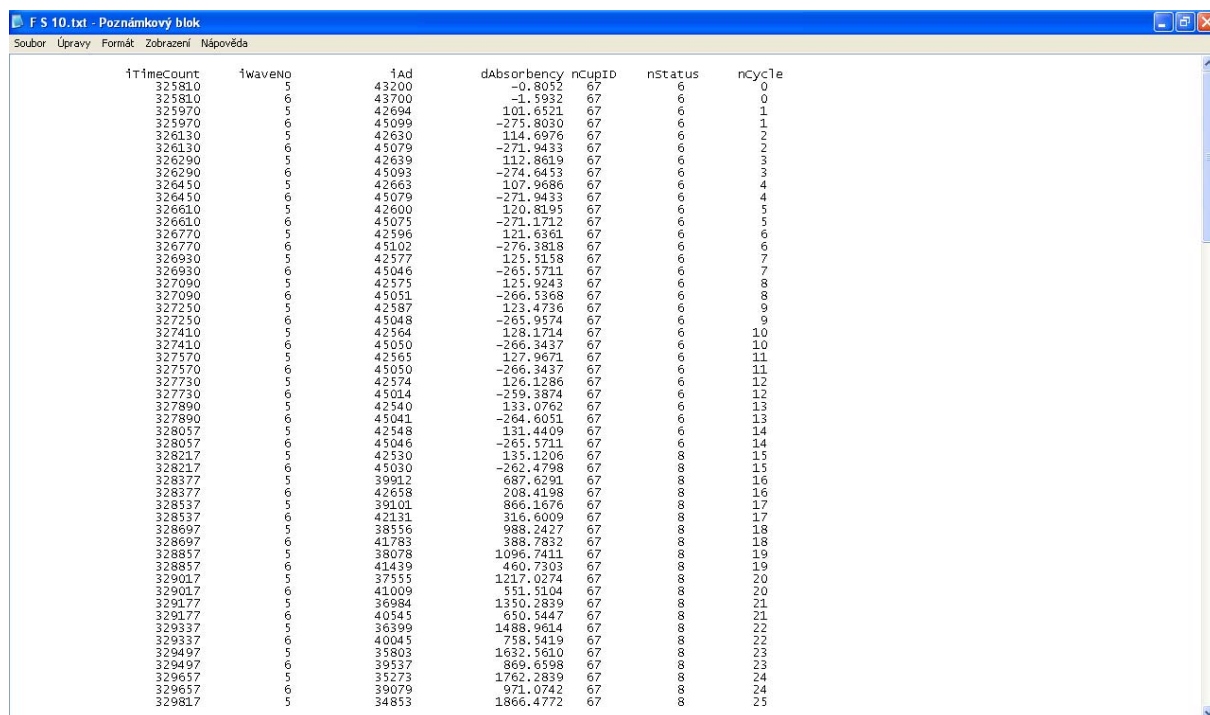
Při možnosti „jedna vlnová délka“ dochází selekci dat a to na absorbanci a čas. Tyto data je pak třeba dále matematicky upravit tak aby byli v příslušných jednotkách. Tato volba se využívá při metodách TEAC, DPPH.

Pokud je označena volba „rozdíl vlnových délek“ opět dochází k selekci dat absorbance a času avšak kromě přepočtu na příslušné jednotky ještě dochází k realizaci výpočtu rozdílu absorbance. Užívá se pro metody FRAP.

### Načítání dat

Tato funkce je realizována pomocí tlačítka pojmenovaného „Načti data“. Data jsou načítána ze souboru typu \*.txt. Po otevření daného souboru dochází k zobrazení přepočítaných dat v okně a zároveň dochází k vykreslení grafu. Z důvodů vyhlazení křivek v grafu prochází všechny hodnoty absorbance mediánovým filtrem.

Další možností je načítání dat ze souboru typu \*.xls pomocí tlačítka „načti data \*.xls“.



iTimeCount	iWaveNo	iAd	dAbsorbency	ncupID	nStatus	nCycle
325810	5	43200	-0.8032	67	6	0
325810	6	43700	-1.5932	67	6	0
325970	5	42694	101.6521	67	6	1
325970	6	45099	-275.8030	67	6	1
326130	5	42630	114.6976	67	6	2
326130	6	45079	-271.9433	67	6	2
326290	5	42639	112.8619	67	6	3
326290	6	45093	-274.6453	67	6	3
326450	5	42663	107.9686	67	6	4
326450	6	45079	-271.9433	67	6	4
326610	5	42600	120.8195	67	6	5
326610	6	45075	-271.1712	67	6	5
326770	5	42596	121.6361	67	6	6
326770	6	45102	-276.3818	67	6	6
326930	5	42577	125.5138	67	6	7
326930	6	45046	-265.5711	67	6	7
327090	5	42575	125.9243	67	6	8
327090	6	45051	-266.5368	67	6	8
327250	5	42587	123.4736	67	6	9
327250	6	45048	-265.9574	67	6	9
327410	5	42564	128.1714	67	6	10
327410	6	45050	-266.3437	67	6	10
327570	5	42565	127.9671	67	6	11
327570	6	45050	-266.3437	67	6	11
327730	5	42574	126.1286	67	6	12
327730	6	45014	-259.3874	67	6	12
327890	5	42540	133.0762	67	6	13
327890	6	45041	-264.6051	67	6	13
328057	5	42548	131.4409	67	6	14
328057	6	45046	-265.5711	67	6	14
328217	5	42530	135.1206	67	8	15
328217	6	45030	-262.4798	67	8	15
328377	5	39912	687.6291	67	8	16
328377	6	42658	208.4198	67	8	16
328537	5	39101	866.1676	67	8	17
328537	6	42131	316.6009	67	8	17
328697	5	38556	988.2427	67	8	18
328697	6	41783	388.7832	67	8	18
328857	5	38078	1096.7411	67	8	19
328857	6	41439	460.7303	67	8	19
329017	5	37555	1217.0274	67	8	20
329017	6	41009	551.5104	67	8	20
329177	5	36984	1350.2839	67	8	21
329177	6	40545	650.5447	67	8	21
329337	5	36399	1488.9614	67	8	22
329337	6	40045	758.5419	67	8	22
329497	5	35803	1632.5610	67	8	23
329497	6	39537	869.6598	67	8	23
329657	5	35273	1762.2839	67	8	24
329657	6	39079	971.0742	67	8	24
329817	5	34853	1866.4772	67	8	25

Obrázek 17: Ukázka vstupních dat z přístroje BS-200 ve formátu txt

### Odfiltrování pozadí

Tato možnost slouží k odečtení pozadí od signálů. Každá metoda měření má specifické pozadí, které můžeme pomocí souboru tlačítek odfiltrovat. Bohužel v mnoha případech při odečtení pozadí ztratíme i nosnou část signálu.



## Kurzor

Pomůcka, která je uskutečňována pomocí příkazu *ginput*. Po stisknutí tlačítka pod názvem „kurzor“ dochází k zobrazení kříže, po kliknutí na libovolnou pozici v grafu okamžitě vidíme hodnoty x,y tj. času a absorbance v příslušných políčkách.

## Export dat

Pro export matematicky upravených dat do tabulkového editoru (Excel) je užíván příkaz *xlswrite*. Před exportem je nutné zadat název souboru do políčka „Uložit data jako...“, pod kterým budou vyexportovaná data uložena. Vyexportovaná data jsou již po mediánové filtraci a ve stejném pořadí jak jsou vidět v okně programu.

## Ořez osy X

Tento nástroj funguje na základě příkazu *xlim* a slouží k selekci daného úseku grafu. Uživatel zadá rozmezí hodnot času (osy x) do políček a po stisku tlačítka „OŘEŽ“ dochází k zobrazení zajímavého úseku grafu. Data se v okně automaticky zobrazí jen v daném rozmezí.

## Více křivek do jednoho grafu

Tento nástroj slouží k zobrazení více křivek do jednoho grafu. Zakliknutí rámečku nám umožní zobrazit libovolný počet křivek najednou včetně barevného odlišení a legendy, jejíž pozice se mění podle tvaru křivek, tak aby nedošlo k překrytí legendou.

## Kopírování grafu

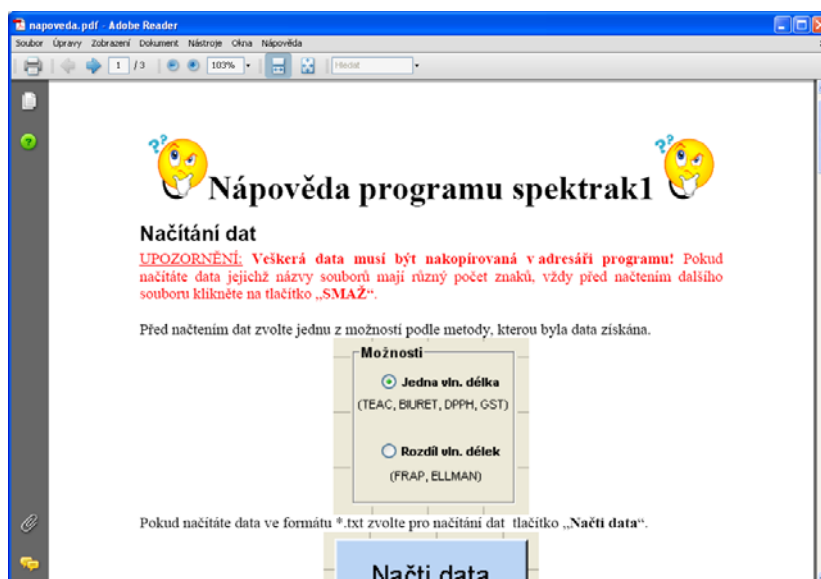
Tlačítko „kopírovat“ nám umožňuje zkopírovat graf a vložit ho do textového editoru (Word) bez toho aniž by bylo nutné použití *prinscreenu*. Po vložení je nutné je po té graf oříznout. Realizace této funkce byla vytvořena pomocí příkazu *print*.

## Smazání grafu

Tlačítko nazvané „SMAŽ“ slouží k vyčištění pole grafu a vymazání všech proměnných.

## Nápověda

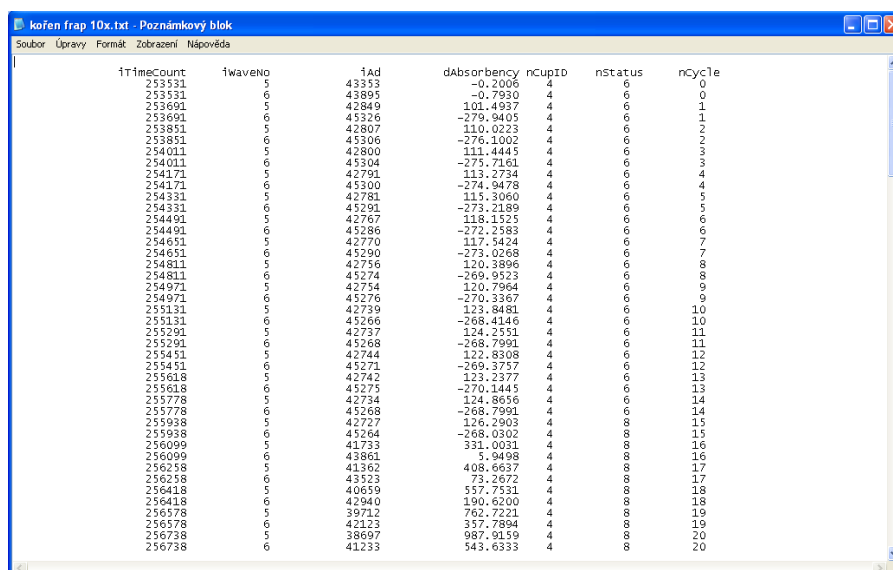
Tato volba slouží k zobrazení nápovědy pro uživatele, kteří se s programem teprve seznamují. Po stisku tlačítka „Nápověda“ se zobrazí podrobný návod k ovládání programu ve formátu pdf.



Obrázek 18: Nápověda programu spektrak1

### 11.1.3 Ukázka práce programu

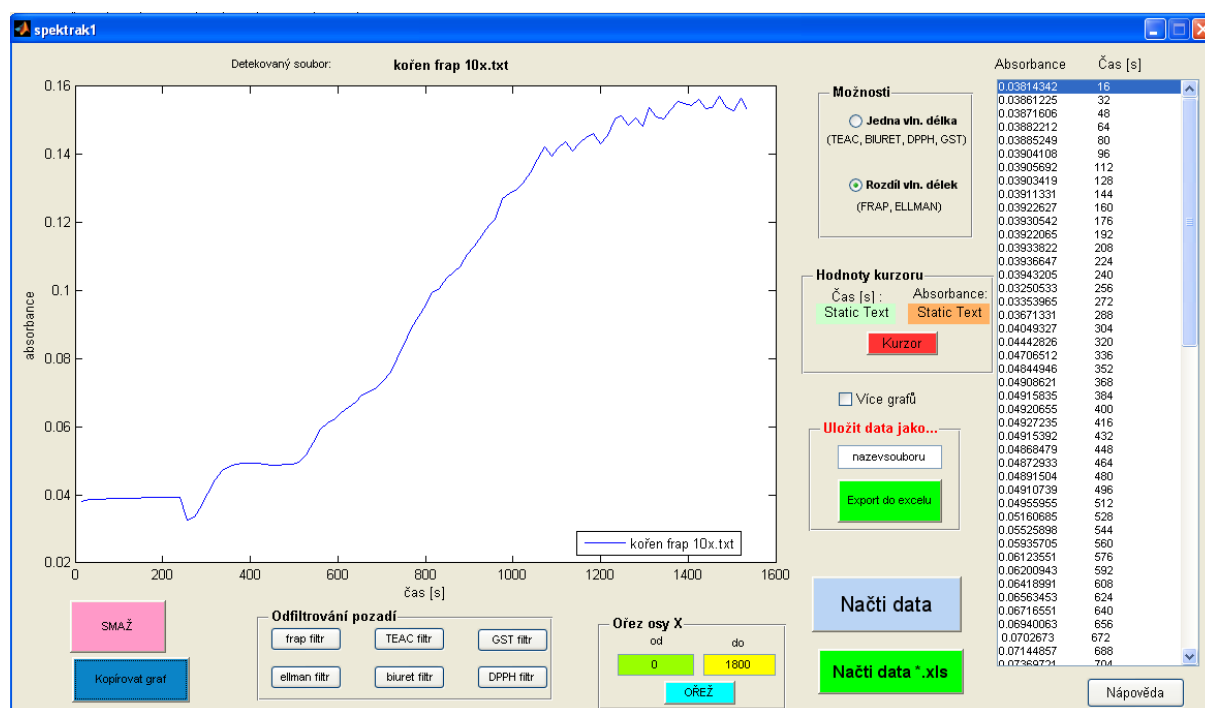
Na obrázcích je vidět s jakými daty a jakým způsobem program pracuje. Na vstupu jsou data ve formátu txt (viz. obr. 19), tedy data obdržená z přístroje MINDRAY BS-200. Z hlediska dalšího zpracování jsou podstatné pouze hodnoty sloupce dAbsorbency (absorbance) a nCycle (cykly). Ostatní sloupce program ignoruje, protože nemají pro další analýzu žádný informativní význam.



iTimeCount	iWaveNo	iAd	dAbsorbency	nCupID	nStatus	nCycle
253531	5	43353	-0.2006	4	6	0
253531	5	43895	-0.7930	4	6	0
253691	5	42849	101.4937	4	6	1
253691	5	45326	-279.9405	4	6	1
253851	5	42807	110.0223	4	6	2
253851	5	45306	-276.1002	4	6	2
254011	5	42800	111.4445	4	6	3
254011	5	45304	-275.7161	4	6	3
254171	5	42797	113.2734	4	6	4
254171	5	45300	-274.9478	4	6	4
254331	5	42781	115.3060	4	6	5
254331	5	45291	-273.2189	4	6	5
254491	5	42767	118.1525	4	6	6
254491	5	45286	-272.2583	4	6	6
254651	5	42770	117.5424	4	6	7
254651	5	45290	-272.0268	4	6	7
254811	5	42756	120.3896	4	6	8
254811	5	45274	-269.9523	4	6	8
254971	5	42754	120.7964	4	6	9
254971	5	45276	-270.3367	4	6	9
255131	5	42739	123.8481	4	6	10
255131	5	45266	-268.4146	4	6	10
255291	5	42737	124.2551	4	6	11
255291	5	45268	-268.7991	4	6	11
255451	5	42744	122.8508	4	6	12
255451	5	45271	-269.3757	4	6	12
255611	5	42742	123.2377	4	6	13
255611	5	45275	-270.1445	4	6	13
255771	5	42734	124.8656	4	6	14
255771	5	45268	-268.7991	4	6	14
255931	5	42727	126.2903	4	8	15
255931	5	45264	-268.0302	4	8	15
256091	5	41733	331.0031	4	8	16
256091	5	43861	5.9498	4	8	16
256251	5	41362	408.6637	4	8	17
256251	5	43521	73.2472	4	8	17
256411	5	40659	557.7531	4	8	18
256411	5	42940	190.6200	4	8	18
256571	5	39712	762.7221	4	8	19
256571	5	42123	357.7894	4	8	19
256731	5	38697	987.9159	4	8	20
256731	5	41233	543.6333	4	8	20

Obrázek 19: Vstupní data

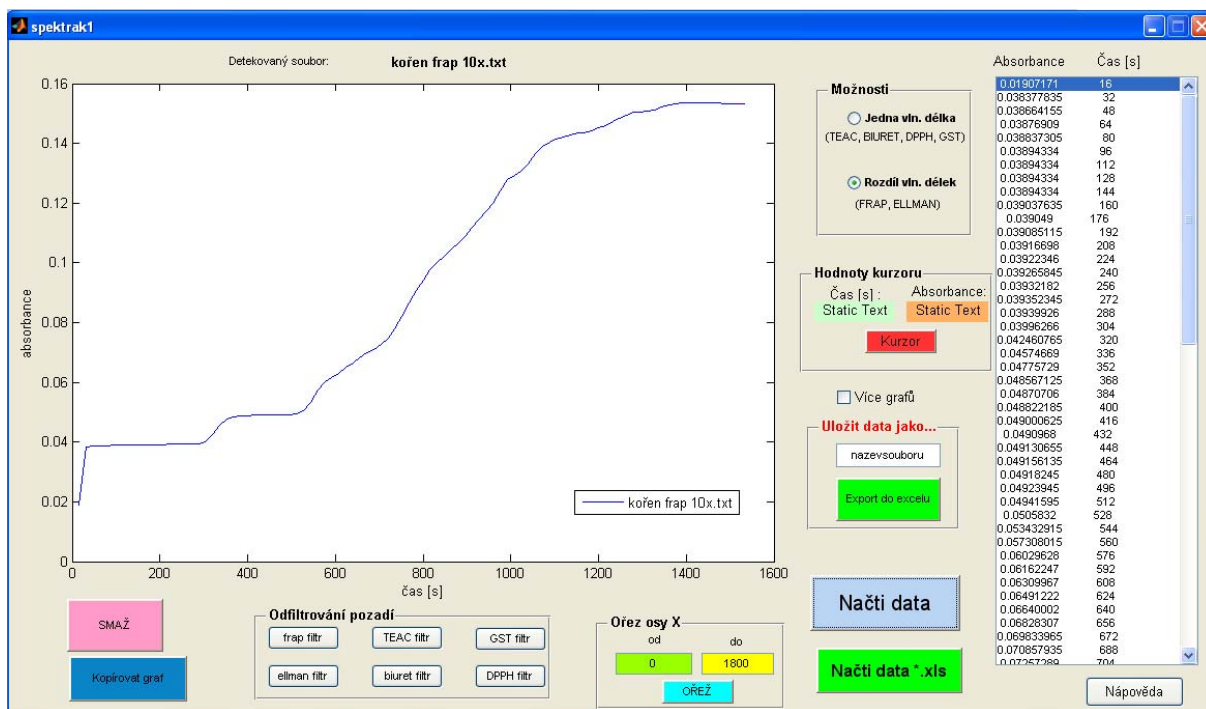
Po načtení obou sloupců dojde k jejich dalšímu zpracování tj. přepočítání na příslušné jednotky, popř. i k vzájemnému odečtení hodnot absorbance v jednom cyklu (volba rozdíl vlnových délek). Hodnoty sloupce dAbsorbency se přepočítávají na jednotky absorbance a hodnoty nCycle na jednotky času (sekundy).



Obrázek 20: Signál FRAP bez použití mediánového filtru



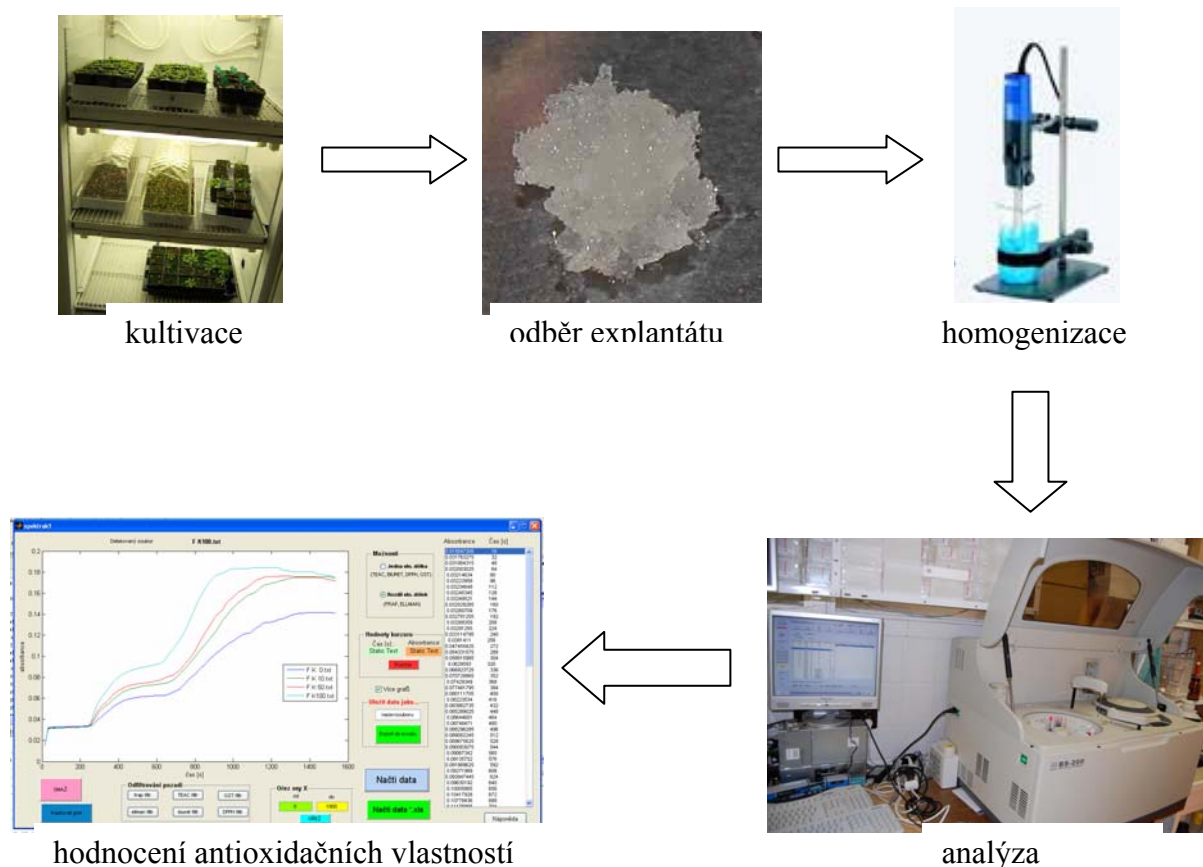
Potom program vykreslí graf závislosti absorpance na čase a vypíše do tabulky přepočítaná data, podle kterých byl graf vykreslen (viz. obr. 20). Pro lepší reprodukovatelnost výsledků je v programu realizován mediánový filtr, který nám křivku vyhladí. Ztráta relevantních dat filtrace je minimální a nemá na výsledek podstatný vliv. V tabulce s daty se zobrazí i mediánově filtrované hodnoty absorpance (viz. obr. 21).



**Obrázek 21:** Signál pro průchodu mediánovým filtrem

## 11.2 Experimentální schéma

Na schématu je zobrazen zkrácený postup práce (viz. obr. 22), pomocí něhož je možné dospět až k vyhodnocení antioxidační aktivity křídlatky japonské. Nejprve byla rostlina kultivována poté následoval odběr explantátu a jeho homogenizace. Po procesu homogenizace byly vzorky analyzovány ve spektrometru a získaná data byla použita pro vyhodnocení antioxidačních vlastností vytvořeným programem.



**Obrázek 22:** Schéma pracovního postupu experimentu

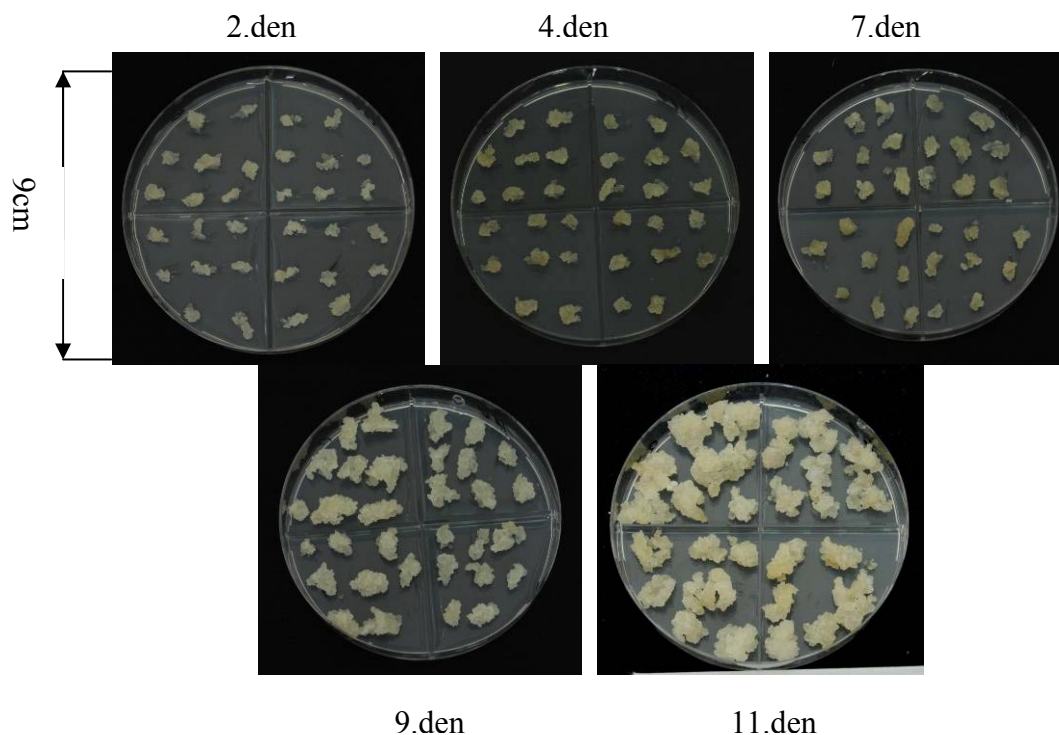
## 11.3 Hmotnostní analýza

### Studium vlivu kademnatých iontů na explantátovou kulturu křídlatku japonskou

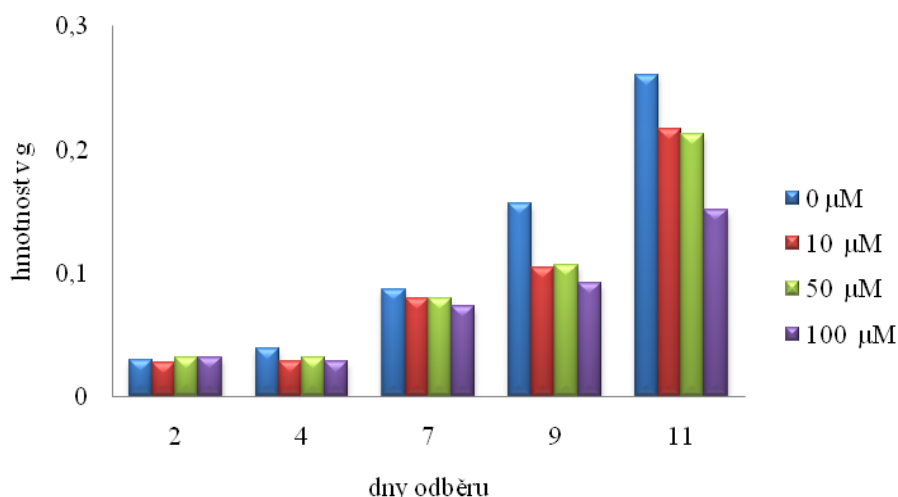
Sledovaným experimentálním objektem byla explantátová kultura křídlatky japonské. Tato kultura byla použita jako model, který se blíží svou podobou celistvé rostlině a může nám poodhalit další kroky ve vývoji biochemických procesů v rostlinách.

Explantáty byly vystaveny působení  $\text{Cd}^{2+}$  iontů. Prvním sledovaným parametrem byl nárůst biomasy gravimetrickou metodou. Po celou dobu experimentu byl pozorován u všech koncentrací přírůstek biomasy. Na Petriho misce byly explantáty rozděleny do 4 sektorů. V každém sektoru byly explantáty s různou koncentrací kademnatých iontů (0, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ).

Při porovnání jednotlivých koncentrací s kontrolou, vykazovalo Cd růstovou inhibici, přičemž se zvyšující se koncentrací kadmia se zvyšovala i inhibice růstu. Inhibiční vliv Cd byl patrný již na první pohled (viz. obr. 23). Tato skutečnost byla následovně ověřena i gravimetricky tj. metodou chemické kvantitativní analýzy, která je založená na vyloučení stanovované složky ve formě málo rozpustné sloučeniny a na jejím převedení na formu vhodnou k vážení.



**Obrázek 23:** Fotografická dokumentace kultivace explantátové kultury křídlatky japonské

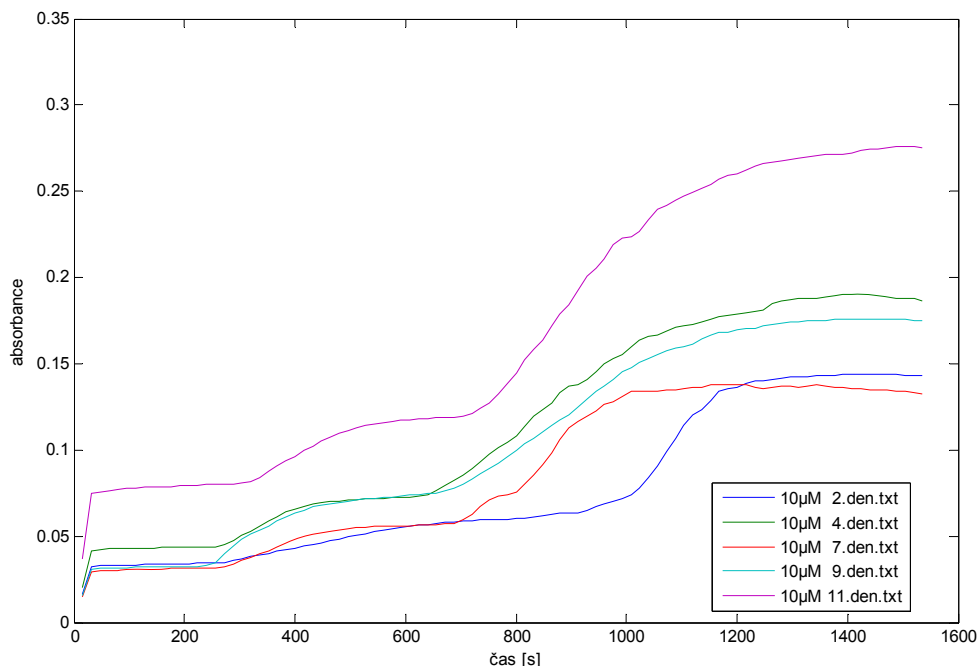


**Obrázek 24:** Vývoj hmotnosti explantátové kultury vystavené působení různých koncentrací kadmennatých iontů po dobu experimentu

Z obrázku 24 je patrné, že v druhém dnu odběru se vliv kadmennatých iontů ještě naplno neprojevil avšak později byl již evidentní jejich inhibiční účinek. Se vzrůstající koncentrací kadmia klesal hmotnostní přírůstek. Naopak při nulové koncentraci kadmennatých iontů byl hmotnostní přírůstek nejmarkantnější.

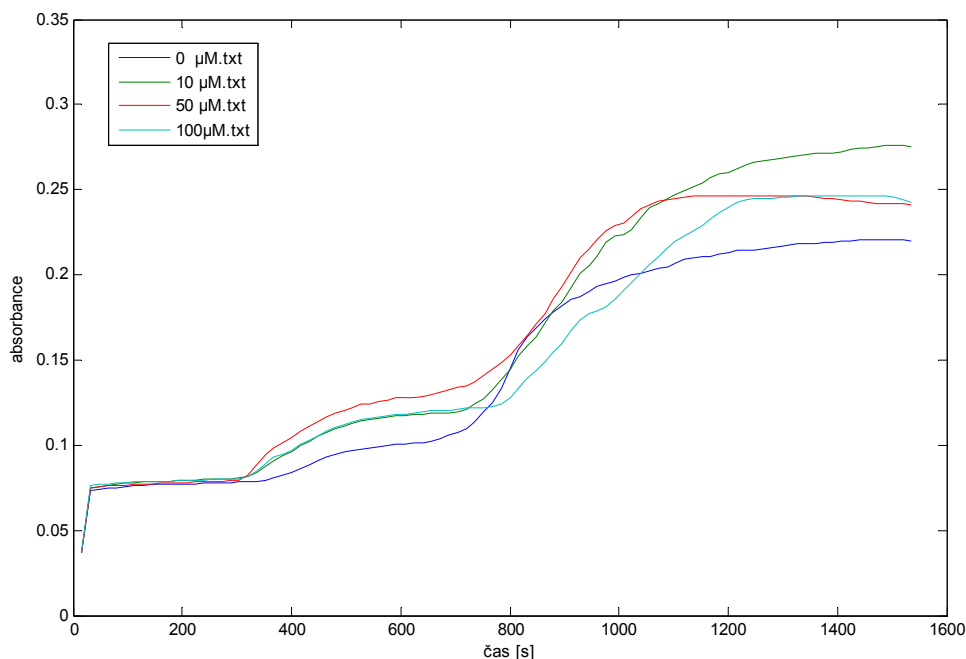
## 11.4 Stanovení antioxidační aktivity

Připravené vzorky křídlatky japonské byli analyzovány spektrometrem MINDRAY BS-200 metodami FRAP, TEAC, DPPH a výsledky následně matematicky zpracovány programem spektrak1. V průběhu času ( 2.-11.den ) je evidentní, že vzorky měřené metodou FRAP se stejnou koncentrací kadmennatých iontů zvyšují svoji absorbanci tzn. antioxidační aktivitu (viz obr.25).



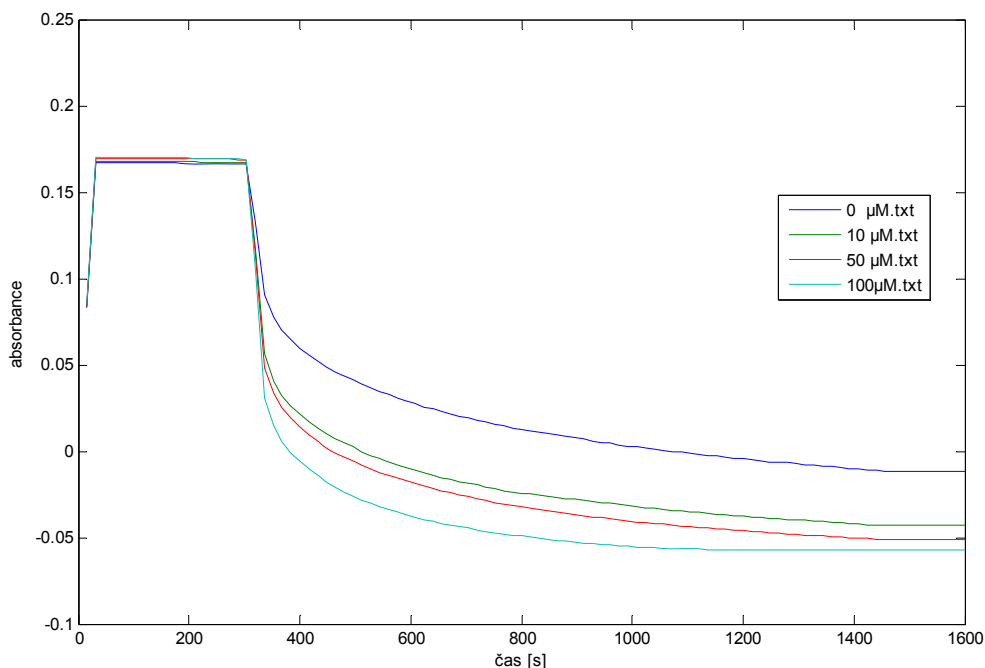
**Obrázek 25:** Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení kadmennatých iontů o koncentraci 10μM po dobu experimentu – metoda FRAP

Pokud byly sledovány vzorky křídlatky japonské s jednotlivými koncentracemi kademnatých iontů v jedenáctém dnu odběru vykazovali nejmenší antioxidační aktivitu vzorky s koncentrací  $0\mu\text{M}$  a nejvyšší měli vzorky o koncentraci  $10\mu\text{M}$  (viz obr. 26).



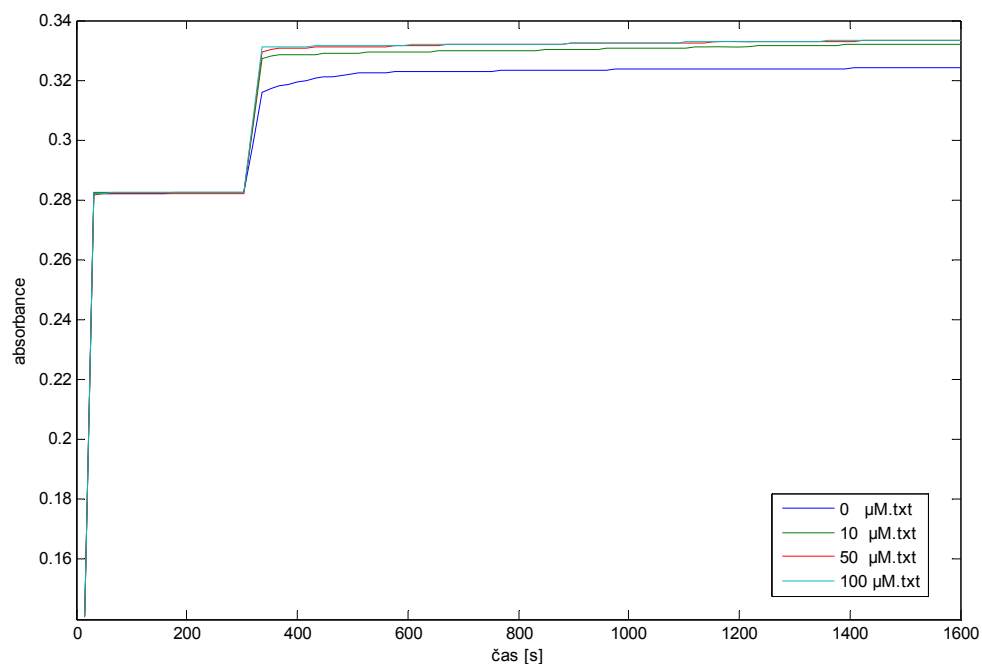
**Obrázek 26:** Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu – metoda FRAP

Při měření metodou TEAC byl rovněž sledován vliv jednotlivých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu odběru. Z obr. 27 je vidět, že největší antioxidační aktivitu (absorbanci) vykazuje vzorek o koncentraci  $0\mu\text{M}$  tj. bez kadmia. Naopak nejmenší antioxidační aktivita byla zjištěna u vzorku o koncentraci  $100\mu\text{M}$ .



**Obrázek 27:** Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu – metoda TEAC

Měření metodou DPPH probíhalo obdobně jako u předchozích metod. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u vzorku s koncentrací 10 $\mu$ M kadmia a nejmenší u vzorku s koncentrací 0 $\mu$ M – bez kadmia.



**Obrázek 28:** *Reakční kinetika explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kademnatých iontů v jedenáctém dnu – metoda DPPH*

## 12 Závěr

Nejdříve se připravily explantátové kultury křídlatky japonské do Petriho misky, které byly následně vystaveny účinkům kadmia o koncentracích 0, 10, 50, 100 $\mu$ M. Kadmium mělo na růst explantátových kultur inhibiční vliv. S jeho zvyšující koncentrací byla inhibice růstu výraznější. Tento fakt byl patrný již z fotografické dokumentace a následná hmotnostní analýza tuto skutečnost potvrdila. Potom následoval odběr explantátu a jeho homogenizace. Homogenizace explantátů probíhala pomocí tyčového homogenizéru, ultrazvuku, třepačky a odstředění bylo realizováno prostřednictvím centrifugy. Takto připravené vzorky byly vloženy ve zkumavkách do automatického spektrometru MINDRAY BS-200 v němž proběhla analýza metodami FRAP, TEAC a DPPH.

Pro matematickou analýzu a zpracování dat poskytnutých automatickým spektrometrem byl vyvinut program spektrak1. Tento program je realizován v programovém jazyku MATLAB v grafickém prostředí GUI. Program získaná data přepočítává, filtruje mediánovým filtrem, vykresluje z nich grafy a umožňuje s nimi další práci pomocí různých nástrojů. V nástrojích jsou obsaženy funkce pro ořez grafu, kopírování grafu, export dat do Excelu, odečítání pomocí kurzoru či odečtení pozadí signálu. Pro ulehčení práce s programem je implementována nápověda.

Ze získaných dat byly pomocí programu spektrak1 realizovány grafy závislosti absorpance na času. Z hodnot absorpance vyplývá antioxidační aktivita. První graf reprezentuje reakční kinetiku explantátu křídlatky japonské vystavené působení kadmia o koncentraci 10 $\mu$ M po dobu experimentu (11 dní) měřeného metodou FRAP. Z tohoto grafu je patrné, že antioxidační aktivita v průběhu experimentu postupně rostla.

Další grafy zachycují reakční kinetiku explantátové kultury křídlatky japonské vystavené působení různých koncentrací kadmiových iontů (0,10,50,100 $\mu$ M) měřenou metodami FRAP, TEAC a DPPH v jedenáctém dnu experimentu. U metody FRAP je evidentní, že největší antioxidační aktivitu vykazuje vzorek o 10 $\mu$ M koncentraci kadmia. Při měření metodou TEAC vykazoval největší antioxidační aktivitu vzorek, jež nebyl vystaven vlivu kadmia. Výsledky měření antioxidační aktivity metodou DPPH korelují s metodou FRAP tzn. nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u vzorku s koncentrací kadmia 10 $\mu$ M.

## 13 Seznam zkratek

IAA – kyselina indolyl-3-octová  
IBA - kyselina indolyl-3-másečná  
2,4-D – kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová  
NAA – kyselina  $\alpha$ -naftylacetová  
BAP – benzylaminopurin  
IPA – 6-dimethylaminopurin  
ABA – Kyselina abscisová  
PA – Polyamidy  
ROS – reaktivní formy kyslíku  
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová  
FRAP – Ferric Reducting Ability Plasma  
HPLC – High Performance Liquid Chromatography  
TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity  
ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity  
DPPH – 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl  
ABTS – 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin) -6-sulfonát  
AAHP – 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid  
ABAP – 2,2'-azobis-2-methyl-propionamidin  
NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát  
TPTZ – 2,4,6-tripidyl-S-triazin  
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová  
DMSO – dimethylsulfoxid  
GSH – redukovaný glutathion



## 14 Literatura

- [1] PAZDERA, J. *Darius* [online]. 2005 [cit. 2010-05-25]. Antioxidanty. Dostupné z WWW: <<http://www.darius.cz>>.
- [2] VLAŠÍNOVÁ, H., HAVEL, L. Continuous somatic embryogenesis in Japanese maple (*Acer palmatum* Thunb.). *Plant Physiol.*, 1999, 154, s. 212-218.
- [3] KOVÁČ, J. *Explantátové kultury rostlin*. Olomouc : UP, 1995. 140 s.
- [4] PROCHÁZKA, S., et al. *Fyziologie rostlin*. Praha : Academia, 1998. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- [5] KOCIÁN, P. *Květena ČR* [online]. 2005 [cit. 2010-05-16]. Křídlatka japonská. Dostupné z WWW: <<http://www.kvetenacr.cz>>.
- [6] PAZDERA, Z. *Reynoutria japonica* [online]. 2005 [cit. 2010-05-16]. Fotoherbář Wendys. Dostupné z WWW: <<http://botanika.wendys.cz>>.
- [7] PROSSER, V., et al. *Experimentální metody biofyziky*. Praha : Academia, 1989.
- [8] Wikipedia [online]. 2010 [cit. 2010-05-16]. Optický hranol. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org>>.
- [9] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s.
- [10] VEJRAŽKA, M. *Wikipedia* [online]. 2008 [cit. 2010-05-16]. Spektrofotometr. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org>>.
- [11] MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance : Trends in Plant Science. *Trends Plant Sci.* 2002, 9, s. 405-410. ISSN 1360-1385.
- [12] NEIL, S., et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 372, s. 1237-1247. ISSN 0022-0957.
- [13] VRÁNOVÁ, E., et al. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 372, s. 1227-1236. ISSN ISI:000175693600002.
- [14] PASQUALINI, S., et al. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology*. 2003, 3, s. 1122-1134. ISSN 0032-0889.
- [15] VACCA, A., et al. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology*. 2004, 3, s. 1100-1112. ISSN 0032-0889.
- [16] CABANE, M., et al. Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant Physiology*. 2004, 2, s. 586-594. ISSN 0032-0889.
- [17] JABS, T., et al. Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub>(-) from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997, 9, s. 4800-4805. ISSN 0027-8424.
- [18] LEVINE, A., et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the Oxidative Burst Orchestrates the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response. *Cell*. 1994, 4, s. 583-593. ISSN 0092-8674.

- [19] CHEN, Z.; GALLIE, R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*. 2004, 5, s. 1143-1162. ISSN 1040-4651.
- [20] SHALATA, A., et al. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*. 2001, 4, s. 487-494. ISSN 0031-9317.
- [21] ALSCHER, G., et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 372, s. 1331-1341. ISSN 0022-0957.
- [22] PITERKOVÁ, J., et al. Oxidative stress: Localisation of reactive oxygen species formation and degradation in plant tissue. *Chemické Listy*. 2005, 7, s. 455-466. ISSN 0009-2770.
- [23] GOBEL, C., et al. Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 52, s. 52834-52840. ISSN 0021-9258.
- [24] SCANDALIOS, G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in genetics*. 1990, 28, s. 1-41. Dostupný také z WWW: <<http://www.scopus.com>>.
- [25] DAT, J., et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000, 5, s. 779-795. ISSN 1420-682X.
- [26] WINSTON, GW. *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. New York : Wiley-Liss, 1990.
- [27] WOJTASZEK, P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*. 1997, 322, s. 681-692. ISSN 0264-6021.
- [28] HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London*. 1934, 147, s. 332-351.
- [29] FENTON, H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* 1884, 65, s. 899 - 910.
- [30] ŠTEFÁNEK, J. *Medicina, nemoci, studium na 1.LF UK* [online]. 2008 [cit. 2010-05-17]. Nedostatek železa. Dostupné z WWW: <<http://www.stefajir.cz>>.
- [31] MURRAY, R., et al. *Harperova biochemie*. Jinočany : H & H, 2002. 871 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [32] *Wikipedia* [online]. 2007 [cit. 2010-05-17]. Rutin. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org>>.
- [33] PAULOVÁ, H., et al. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, 4, s. 174-179. ISSN 0009-2770.
- [34] ZLOCH, Z., et al. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. *Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu*. 2004.
- [35] FIRÁKOVÁ, S., et al. Kvantitativní vztahy mezi strukturou a schopností flavonoidů redukovat železitý komplex . *Chemické listy*. 2006, 100, s. 980-986.
- [36] FIDLER, M.; KOLÁŘOVÁ, L. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 2009, 103, s. 232-235.

- [37] Medesa [online]. 2007 [cit. 2010-05-17]. Biochemický analyzátor. Dostupné z WWW: <<http://www.medesa.cz>>.
- [38] Vitrum [online]. 2008 [cit. 2010-05-17]. Centrifuga Mikro 200. Dostupné z WWW: <<http://www.vitrum.cz>>.
- [39] Fisher Scientific [online]. 2007 [cit. 2010-05-17]. Minitřepačka MS3 digital. Dostupné z WWW: <<http://www.thermofisher.cz>>.